

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie  
Charité-Campus Virchow Klinikum und Campus Charité Mitte  
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin  
(Direktor: Professor Dr. med. N. Suttorp)

## **Endothel und Entzündung: Pathomechanismen der bakteriellen Endothelaktivierung**

### **HABILITATIONSSCHRIFT**

Zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Experimentelle Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Stefan Hippenstiel  
geboren am 03.05.1966 in Siegen

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek  
Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Eingereicht am: 06.04.2003  
Tag der letzten Prüfung: 23.10.2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. H.-J. Schnittler, Dresden  
2. Prof. Dr. P. Zabel, Borstel

Für meine Eltern  
Sieglinde und Klaus Hippenstiel  
und meine Frau  
Konstanze Scheurer

## **Abstrakt**

### Endothel und Entzündung: Pathomechanismen der bakteriellen Endothelaktivierung

Die Aktivierung von Endothelzellen durch Bakterien und ihre Produkte trägt wesentlich zur Ausbildung klinischer Symptome in bakteriellen Infektionen bei.

Die Freisetzung von Chemo- und Zytokinen führt im Konzert mit der Expression von Adhäsionsmolekülen durch das Endothel zur Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten. Zur Regulation der Entzündungsreaktion tragen parakrine und systemische Effekte, ausgelöst durch die Liberation von vasoaktiven Substanzen und Zytokinen durch Endothelzellen, bei. Der Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion, gekennzeichnet durch den Verlust der Permselektivität der endothelialen Grenzschicht, verursacht Ödembildung.

In dieser Arbeit wurde die molekulare Interaktion von Bakterien und ihren Produkten mit Endothelzellen untersucht. Effekte auf die Rekrutierung von Granulozyten und die endotheliale Barrierefunktion wurden charakterisiert. Dabei konnten aktivierte Signalwege identifiziert werden. Darauf basierend folgte die Entwicklung erster therapeutischer Ansätze.

Zusammengefasst erbrachten diese experimentellen Untersuchungen neue Erkenntnisse zum Verständnis der Bakterien-Endothel Interaktion.

## **Abstract**

### Endothelium and infection: pathomechanisms of bacterial endothelial activation

Activation of endothelial cells by bacteria and their products contributed significantly to clinical signs of bacterial infections. Liberation of chemo- and cytokines in concert with expression of adhesion molecules by the endothelium resulted in recruitment of granulocytes. Paracrine and systemic effects of vasoactive agents and cytokines secreted by endothelial cells contributed the regulation of inflammation. Loss of endothelial barrier function induced edema formation.

This postdoctoral lecture qualification addressed the molecular interaction of bacteria and their products with endothelial cells. The recruitment of granulocytes, the regulation of endothelial barrier function and activated signalling pathways in endothelial cells were analyzed. Based on these experiments new therapeutic strategies have been tested.

In summary, extended these experimental investigations the understanding of bacterial-endothelial interaction.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Inhaltsverzeichnis	4
II Zusammenstellung ausgewählter Publikationen (chronologisch)	7
III Liste der Abkürzungen	10
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
<b>2 Das Endothel in der akuten Entzündung</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Der erste Kontakt: Pathogen-Membran Interaktion</b>	<b>14</b>
2.1.1 Bakterielle Adhärenz	14
2.1.2 Bakterielle Toxine	16
2.1.3 Rezeptor-mediierte Aktivierung	18
<b>2.2 Invasion des Endothels</b>	<b>20</b>
2.2.1 <i>Listeria monozytogenes</i>	21
2.2.2 <i>Chlamydia pneumoniae</i>	22
2.2.3 <i>Bartonella henselae</i>	23
<b>2.3 Das Endothel in der Wirtsantwort</b>	<b>24</b>
2.3.1 Stimulation des Endothels	25
2.3.2 Proinflammatorische Signaltransduktion in Endothelzellen	27
2.3.2.1 Kleine GTP-bindende Rho-Proteine	27
2.3.2.2 p38 Mitogen aktivierte Protein Kinase	30
2.3.2.3 Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B	31
2.3.3 Rekrutierung von Entzündungszellen	34
2.3.3.1 Leukozytäre Liganden	34
2.3.3.2 Rollen, Adhärenzen und Transmigrieren von PMN	35
2.3.3.3 Endotheliale Adhäsionsmoleküle	36
2.3.3.4 Selektine	37
2.3.3.5 Immunglobulin-Superfamilie	38

2.3.4 Endotheliale Permeabilität	38
2.3.4.1 Transzelluläre Permeabilität	40
2.3.4.2 Parazelluläre Permeabilität	42
2.3.4.3 Zytoskelett	43
<b>2.4 Konsequenzen der Endothelaktivierung</b>	<b>46</b>
<b>3 Eigene Arbeiten – Zielsetzung</b>	<b>48</b>
<b>4 Darstellung der eigenen Arbeiten</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Rho-Proteine und Signaltransduktion</b>	<b>50</b>
4.1.1 Funktion von Rho-Proteinen in der inflammatorischen Signaltransduktion von Endothelzellen	51
4.1.2 Rho-Proteine und endotheliale Apoptose	53
<b>4.2 Regulation endothelialer Permeabilität</b>	<b>55</b>
4.2.1 Parazelluläre Permeabilität	56
4.2.2 Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion	58
4.2.3 Transzelluläre Permeabilität	60
<b>4.3 Regulation der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle</b>	<b>62</b>
4.3.1 Porenbildende Exotoxine	63
4.3.2 Intrazelluläre Bakterien	64
<b>4.4 Übersicht über die Interaktion von Pathogenen mit dem     Endothel</b>	<b>66</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Funktion von Rho-Proteinen in Endothelzellen</b>	<b>67</b>
<b>5.2 Parazelluläre endotheliale Permeabilität</b>	<b>70</b>
<b>5.3 Transzelluläre endotheliale Permeabilität</b>	<b>73</b>

<b>5.4 Therapie der endothelialen Schrankenstörung</b>	<b>75</b>
<b>5.5 Aktivierung von Endothelzellen durch Bakterien und bakterielle Produkte</b>	<b>77</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6.1 Rho-Proteine</b>	<b>85</b>
<b>6.2 Endotheliale Barrierefunktion</b>	<b>86</b>
<b>6.3 Leukozytenrekrutierung</b>	<b>87</b>
<b>Literatur</b>	<b>88</b>
<b>Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>112</b>

## II Zusammenstellung ausgewählter Publikationen (chronologisch)

- Krüll, M., C. Dold, S. Hippenstiel, S. Rosseau, J. Lohmeyer, and N. Suttorp. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin potently induce neutrophil adhesion to human endothelial cells. *J. Immunol.* 157: 4133-4140, 1996. **1 H**
- Suttorp, N., P. Ehreiser, S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, H. Tenor, and C. Schudt. Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung* 174: 181-194, 1996. **2 H**
- Hippenstiel, S., S. Tannert-Otto, N. Vollrath, M. Krüll, I. Just, K. Aktories, C. von Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Glucosylation of small GTP-binding proteins disrupts endothelial barrier function. *Am. J. Physiol.* 272: L38-43, 1997. **3 H**
- Krüll, M., R. Nöst, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J. Immunol.* 159: 1970-1976, 1997. **4 H**
- Schwarzer, N., R. Nöst, J. Seybold, S. K. Parida, O. Fuhrmann, M. Krüll, R. Schmidt, R. Newton, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor- $\kappa$ B activation and E-selectin expression in human endothelial cells. *J. Immunol.* 161: 3010-3018, 1998. **5 H**
- Hippenstiel, S., T. Kratz, M. Krüll, J. Seybold, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Inhibition of Rho proteins blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 830-834, 1998. **6 H**

Hippenstiel, S., M. Krüll, A. Ikemann, W. Risau, M. Clauss, and N. Suttorp. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 274: L678-L684, 1998. **7 H**

Krüll, M., A. C. Klucken, F. N. Wuppermann, O. Fuhrmann, C. Magerl, J. Seybold, S. Hippenstiel, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp. Endothelial cell activation following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J. Immunol.* 162: 4834-4841, 1999. **8 H**

Hippenstiel, S., S. Soeth, B. Kellas, O. Fuhrmann, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, M. Goebeler, S. Ludwig, and N. Suttorp. Rho protein and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 95:3044-3051, 2000. **9 H**

Fuhrmann, O., M. Arvand, M. Krüll, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio and N. Suttorp. *Bartonella henselae* outer membrane proteins (omp) induces NF- $\kappa$ B-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Inf. Immun.* 69:5088-5097, 2001. **10 H**

Clauss, M., C. Sunderkötter, B. Sveinbjörnsson, S. Hippenstiel, A. Willuweit, M. Marino, E. Haas, R. Seljelid, P. Scheurich, N. Suttorp, M. Grell, and W. Risau. A permissive role for TNF- $\alpha$  in VEGF-induced vascular permeability. *Blood* 97:1321-1329, 2001. **11 H**

Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krüll, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schütte, and N. Suttorp. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ. Res.* 91:618-625, 2002. **12 H**



- Hippenstiel, S., B. Schmeck, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) related nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) translocation but not inhibitor kappa-B (I $\kappa$ -B)-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells.  
*Biochem. Pharmacol.* 64:971-977, 2002. **13 H**
- Hippenstiel, S., B. Schmeck, P. Dje N`Guessan, J. Seybold, M. Krüll, K. Preissner, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells.  
*Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283:L830-838, 2002. **14 H**
- Issbrücker K., H.H. Marti, S. Hippenstiel, G. Springmann, R. Vosswinkel, A. Gaumann, G. Breier, H. Drexler, N. Suttorp, and M. Clauss. p38 MAPK – A molecular switch between angiogenesis and vascular permeability.  
*FASEB J.* 17:262-264, 2003 **15 H**
- Hippenstiel, S., and N. Suttorp. Interaction of pathogens with the endothelium.  
*Thromb. Haemost.* 89: 18-24, 2003. **16 H**
- Schmeck, B., M. Brunch, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. Rho protein-inhibition blocks Prostaglandin H synthase-2-expression by proinflammatory mediators in endothelial cells.  
*Akzeptiert bei Inflammation.* **17 H**
- Hippenstiel, S., H.-W. Mühle, M. Krüll, J. Seybold, and N. Suttorp. Depolymerization of microtubuli induced endothelial barrier dysfunction.  
Eingereicht zur Publikation. **18 H**
- Krüll, M., A. C. Klucken, C. Magerl, J. Seybold, S. Ludwig, M. Maas, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. *Chlamydia pneumoniae* mediated activation of mitogen-activated protein kinase cascades in human endothelial cells.  
Eingereicht zur Publikation. **19 H**

### III Liste der Abkürzungen

(c)AMP	(Zyklisches) Adenosinmonophosphat
(c)GMP	(Zyklisches) Guanosinmonophosphat
ADM	Adrenomedullin
COX	Cyclooxygenase
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ERK	Extracellular signal-activated protein kinase
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	Rho GDP Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosin di-Phosphat
GEF	GDP Austauschfaktor
GTP	Guanosin tri-Phosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HlyA	<i>E. coli</i> Hämolysin
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IAP	Inhibitors of apoptosis
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin 8
KSHV	Kaposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAPKAP	MAPK assoziierte Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MLC	Myosinleichtkette
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
NIK	NF- $\kappa$ B-inducing Kinase
NO(S)	Stickoxid(synthase)

OMP	Outer membrane protein
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PDE	Phosphodiesterase
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
TcdB	<i>Clostridium difficile</i> Toxin
TLR	Toll-artiger Rezeptor
tmTNF	Transmembranöser Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TNF	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TTS	Typ III Sekretionssystem
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF Rezeptor
VVO	Vaskulär vesikuläres Organell

## 1 Einleitung

Akute Entzündungen sind durch die klassischen Zeichen *Rubor*, *Dolor*, *Tumor* und *Functio laesa* charakterisiert. Die Aktivierung von Endothelzellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse trägt wesentlich zur Ausbildung dieser Symptome bei. Zwischen Blut und umliegendem Gewebe bildet das einschichtige Endothel eine interaktive Barriere. In dieser Funktion ist es u.a. gegenüber multiplen Pathogenen und ihren Produkten, Mediatoren der zellulären und humoralen Immunabwehr sowie physikalischen und chemischen Reizen exponiert.

Das Endothel ist an der Regulation der entzündlichen Reaktion maßgeblich beteiligt: Die Freisetzung von Chemo- und Zytokinen führt im Konzert mit der Expression von Adhäsionsmolekülen durch das Endothel zur Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten. Zur Regulation der Entzündungsreaktion tragen parakrine und systemische Effekte, ausgelöst durch die Liberation von vasoaktiven Substanzen und Zytokinen durch Endothelzellen, bei. Der Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion, gekennzeichnet durch den Verlust der Permselektivität der endothelialen Grenzschicht, verursacht Ödembildung. Diese kann, z.B. in der Lunge, zur massiven Beeinträchtigung der Organfunktion führen. Multiple, miteinander verflochtene Signaltransduktionswege, die teils von Pathogenen und ihren Produkten manipuliert werden, regulieren die biologische Reaktion der Endothelzellen

Dieser hohe Grad der Interaktion der beteiligten Reaktionspartner bedingt, dass einzelne Aspekte der Pathomechanismen der Endothel-Stimulation an verschiedenen Stellen dieser Arbeit von verschiedenen Seiten her aufgegriffen werden müssen.

Das Verständnis der der Endothel-Aktivierung zugrundeliegenden Mechanismen kann die Basis für die Erstellung neuer, am Endothel angreifender therapeutischer Strategien sein.

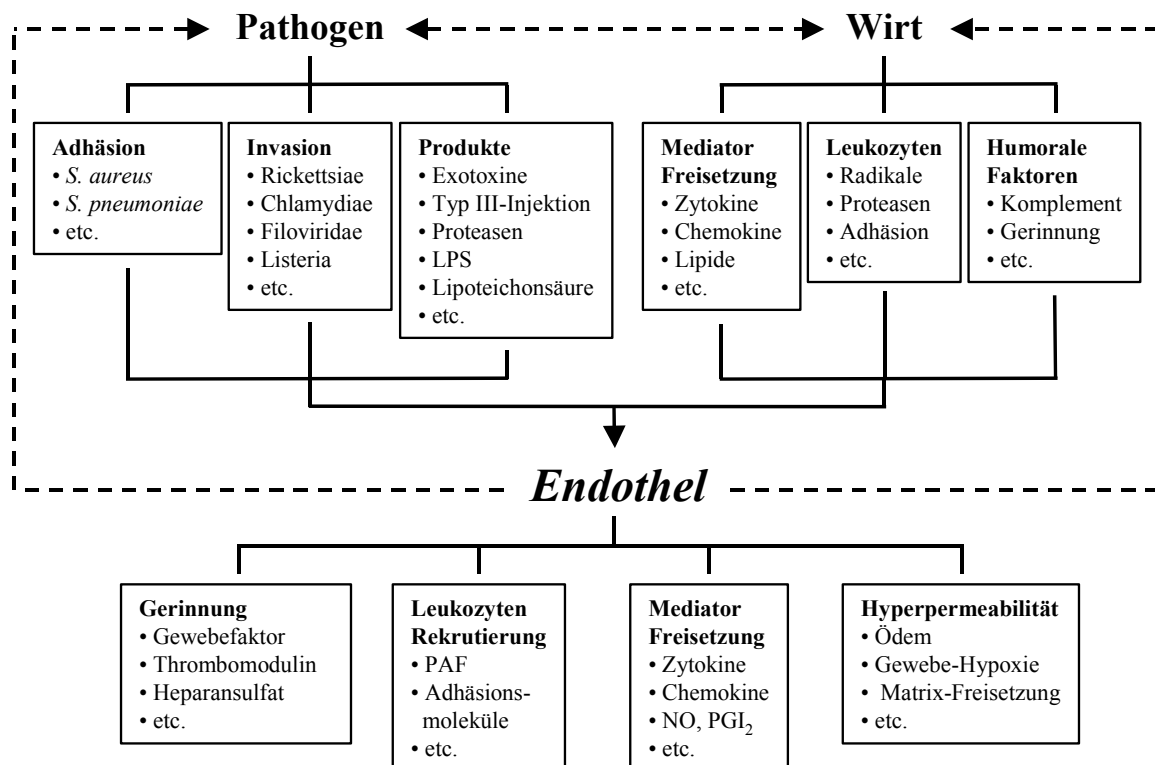
Diese Arbeit stellt ausgewählte Aspekte der entzündlichen Endothel-Aktivierung dar. Eigene Arbeiten fokussierten auf drei Bereiche:

- In der proinflammatorischen Signaltransduktion von Endothelzellen konnten kleine GTP-bindende Rho-Proteine als zentrale Schaltelemente identifiziert werden.
- Untersuchungen zur Regulation der endothelialen Barrierefunktion führten zur Erprobung erster therapeutischer Ansätze.

- Experimente zur Leukozytenrekretierung durch mit Bakterien oder bakteriellen Virulenzfaktoren stimulierten Endothelzellen erbrachten Hinweise auf wesentliche, an der Krankheitsausbildung beteiligte, Signalwege.

## 2 Das Endothel in der akuten Entzündung

Das Endothel bildet eine ca. 1000 m<sup>2</sup> große Grenzschicht zwischen intra- und extravasalem Raum im adulten menschlichen Organismus. Im Rahmen von lokalen und systemischen Entzündungen ist es im Blutstrom zirkulierenden Pathogenen und ihren freigesetzten Agenzien ebenso ausgesetzt wie Faktoren der zellulären und humoralen Abwehr (Abb. 1) (Übersichtsartikel **16 H**).



**Abb.1:** In der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt kommt dem Endothel zentrale Bedeutung zu. Die Adhäsion, Invasion und/oder sezernierte Produkte des Pathogens können das Endothel direkt manipulieren. Aktivierte Leukozyten, humorale Faktoren und während der Wirtsantwort freigesetzte Mediatoren beeinflussen endotheliale Funktionen. Das stimulierte Endothel verliert u.a. seine Barrierefunktion und anti-koagulatorische Oberfläche. Die verschiedenen Faktoren wirken in einem komplexen, dynamischen Prozess aufeinander ein.

Epithelien, die eine wichtige zelluläre Barriere gegenüber Pathogenen bilden, sind zumeist speziellen Subgruppen von Pathogenen ausgesetzt. So mag das urogenitale Epithel mit *Escherichia coli*, aber nicht mit *Streptokokkus pneumoniae* konfrontiert werden. Im Gegensatz dazu können alle Pathogene und ihre Produkte, die den Blutstrom erreichen oder bei lokaler Infektion in den Bereich der Kapillarbetten gelangen, mit Endothelzellen interagieren. Daraus folgt, dass Endothelzellen nicht nur durch Endothel-spezifische Pathogene, sondern auch durch nahezu jedes andere Pathogen und seine spezifischen pathogenen Mechanismen attackiert werden können.

Im Folgenden sollen einige ausgewählte Aspekte der Bakterien-Endothel Interaktion dargestellt werden. Dabei wird besonders auf interessante aktuelle Forschungsergebnisse und für das Verständnis der eigenen Arbeiten wesentliche Inhalte fokussiert.

## **2.1 Der erste Kontakt: Pathogen-Membran Interaktion**

Bereits der Erstkontakt von Bakterien und ihren Produkten mit Endothelzellen kann in einer massiven Stimulation der Endothelzellen resultieren und einen wesentlichen Beitrag zur Ausprägung der Entzündungsreaktion leisten. Neben der direkten Adhärenz von Bakterien an Endothelzellen (2.1.1) spielen von Bakterien freigesetzte Effektormoleküle, z.B. Toxine (2.1.2) oder mit endothelialen Rezeptoren interagierende Moleküle (2.1.3), eine wesentliche Rolle in dieser Pathogen-Wirtszellinteraktion.

### **2.1.1 Bakterielle Adhärenz**

Eine komplexe und sehr heterogene Komposition von Membranstrukturen des Pathogens und des Wirtes vermitteln den Adhäsionsprozess von Pathogenen. Häufig imitieren Oberflächenstrukturen des Pathogens endogene Liganden für Oberflächenstrukturen des Endothels und vermitteln so Adhäsion an oder Aufnahme in das Endothel.

Fibronektin bindendes Protein z.B. fördert die Anheftung und temporäre Invasion von *Staphylokokkus aureus* durch die Bindung von Fibronektin auf der Oberfläche von Endothelzellen (197). Die Expression dieses Moleküls in normalerweise nicht-

invasiven Bakterien induzierte deren Aufnahme in das Endothel und verdeutlicht die Bedeutung dieser molekularen Interaktion (196;197). Neben Fibronectin auf Endothelzellen bindet *S. aureus* an extrazelluläre Matrixproteine wie Vitronectin oder Elastin, was die Komplexität des Adhäsionsprozesses beispielhaft beleuchtet (138;196;197).

Darüber hinaus ermöglicht die Blut-exponierte Lage der Endothelzellen spezielle Invasionsstrategien hochspezialisierter Erreger: *Listeria monocytogenes* infiziert sehr effizient mononukleäre Phagozyten (224). Nach Adhärenz infizierter Monozyten an Endothelzellen breiteten sich Listerien im Endothel aus. Dabei kam der F-Aktin basierten Motilität der Listerien große Bedeutung für den Übergang von Zelle zu Zelle zu (59). Neben der Zell-Zell vermittelten Invasion konnte das listerielle Protein Internalin jedoch auch direkt die Aufnahme des Bakteriums in die Endothelzelle mediieren, so dass Listerien zwei unabhängige Mechanismen zur Attacke des Endothels nutzen können (224).

Wesentlich ist die aktuelle Beobachtung, dass bakterielle Adhäsionsmoleküle als potente Inhibitoren der Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Inflammation wirken können: Das freigesetzte „extracellular adherence protein“ von *S. aureus* blockierte effizient  $\beta_2$ -Integrin vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (40). Offenbar können die biologischen Effekte bakterieller „Adhäsine“ weit über die Funktion der „simplen“ Adhärenz hinaus reichen.

Die Adhäsion von Pathogenen an Endothelzellen ist bereits ausreichend, um komplexe Signaltransduktionswege zu aktivieren: z.B. führte die Anheftung von *E. coli* (203) oder *Chlamydia pneumoniae* (**8 H, 19 H**) an Endothelzellen innerhalb von Minuten zu Endotoxin-unabhängiger Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Dabei ist noch weitgehend unklar, ob und inwieweit die einzelnen aktivierten Signalwege die Adhärenz des Keimes stabilisieren, die Aufnahme des Bakterium induzieren oder bereits Teil der unspezifischen Wirtsantwort des Endothels auf das Pathogen sind. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass äußere Membranproteine der Bakterien („outer membrane proteins“, OMP) für diese Aktivierung bedeutsam sind (33;234;239) (**10 H**).

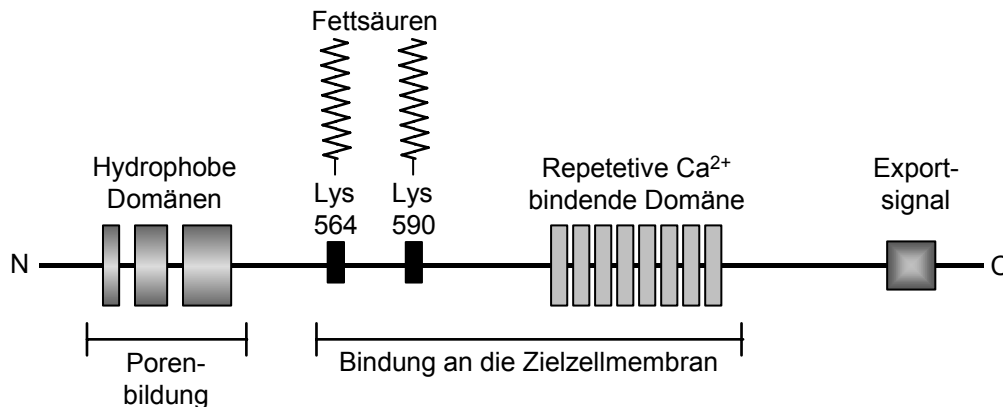
Für die meisten Pathogene, die mit dem Endothel interagieren, ist die Identifikation beteiligter Moleküle auf Seiten beider Interaktionspartner noch nicht erfolgt. Noch weniger Informationen liegen über die ausgelösten Effekte vor. Die gezielte Blockade solcher Adhäsionsmechanismen als potentielle Therapie (oder Prävention) von

bakteriellen Infektionen erscheint attraktiv. Allerdings muss bedacht werden, dass die hohe Redundanz dieser Mechanismen u.U. wirkungsvolle Effekte bei alleiniger Blockade eines Reaktionspartners zunichte macht.

Eigene Untersuchungen adressierten die durch *L. monozytogenes* (**4 H, 5 H**), *C. pneumoniae* (**8 H, 19 H**) und *Bartonella henselae* (**10 H**) induzierte Aktivierung von Endothelzellen.

### 2.1.2 Bakterielle Toxine

Das Endothel ist ein primäres Ziel von Poren-bildenden bakteriellen Exotoxinen (18;19). Typische Vertreter dieser Toxinfamilie sind *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin und *E. coli* Hämolyysin (HlyA) (17). Poren-bildende Exotoxine sind amphipatische Proteine, die unter Interaktion mit Lipidketten und nicht-polaren Anteilen integraler Membranproteine in die Zellmembran von Zielzellen inserieren (Abb. 2). Das Innere der definierten Pore bildet einen hydrophilen Kanal. Diese Pore (Innendurchmesser bei  $\alpha$ -Toxin ca. 1 nm) erlaubt den Fluss von Ionen (17).



**Abb. 2:** Linearisierte Darstellung von *E. coli* Hämolyysin.

Die Rolle von HlyA und *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin für die Aktivierung von Endothelzellen ist relativ gut untersucht. Ein einmaliger Bolus von HlyA z.B. induzierte einen Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion *in vitro* (205) und führte zur Ödembildung in isolierten Kaninchenlungen (191) sowie Ileum-Präparationen (141). Darüber hinaus liberierten HlyA-exponierte Endothelzellen vasoaktive Mediatoren wie Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) oder Stickstoffmonoxid (NO) (205;206;210). Durch die Induktion der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wurde die Rekrutierung

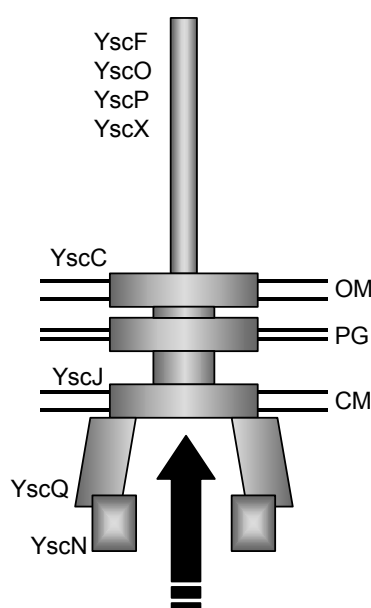


polymorphkerniger Granulozyten an den Ort der Entzündung gesteigert (**1 H**). Insgesamt sind Poren-bildende bakterielle Exotoxine in der Lage, einen stark proinflammatorischen Phänotyp in Endothelzellen hervorzurufen.

Neben diesen Exotoxinen, die sich in die Zellmembran integrieren, binden manche bakteriellen Exotoxine (z.B. Shiga Toxin von enterohämorrhagischen *E. coli*; EHEC) an endotheliale Rezeptoren und induzieren ihre Translokation in das Zytosol der Zellen. Dieser Prozess wird als ein wesentlicher Virulenzfaktor von EHEC angesehen, die das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) hervorrufen (107).

Im Vergleich zu diesen exemplarischen, relativ gut charakterisierten Beispielen für die Aktivierung von Endothelzellen durch bakterielle Toxine, ist wenig über ihre Interaktion mit anderen wichtigen Toxinen bekannt. So ist zwar erkannt, dass das Pneumolysin von *S. pneumoniae* signifikant zu Infektion und Schädigung von Endothelzellen beiträgt, die zugrundeliegende zelluläre Biologie ist jedoch weitgehend unerforscht (248).

Über extrazellulär sekretierte Proteine hinaus scheint durch Bakterien direkt in Endothelzellen injizierten Proteinen wesentliche pathologische Bedeutung zuzukommen. Gram-negative Bakterien sind in der Lage, über ein sog. Typ III Sekretionssystem (TTS) Proteine zu injizieren (Abb. 3) (43): Sowohl extrazelluläre als auch in Phagosomen befindliche Bakterien können potente bakterielle Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle einbringen und damit die zelluläre Signalmaschinerie kontrollieren.



**Abb. 3:** Model des Typ III-Injektisoms von Yersinien. Der aus verschiedenen bakteriellen Proteinen (Ysc) bestehende Apparat durchdringt die äußere Membran (OM), die Peptidoglykanschicht (PG) und die cytoplasmatische Membran (CM) des Bakteriums. Über die „Injektionsnadel“ werden bakterielle Effektorproteine in die Zielzelle eingebracht. Modifiziert nach (43).

Das YopE Protein von *Yersinia* z.B. beeinflusste nach Injektion durch das TTS die Regulation des Zytoskeletts in Endothelzellen (8). Da auch Bakterien, die chronisch das Endothel infizieren, wie z.B. *C. pneumoniae*, offenbar ein TTS exprimieren (144), könnte hier ein neues, noch nahezu unbearbeitetes Forschungsfeld entstehen.

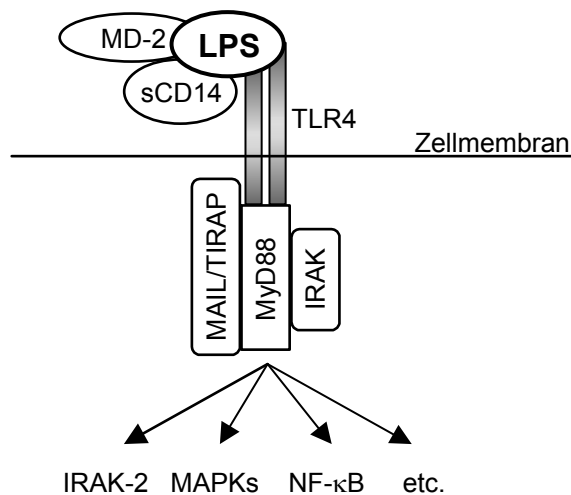
In eigenen Arbeiten wurde die Aktivierung von Endothelzellen durch die bakteriellen Poren-bildenden Toxine *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin und *E. coli* Hämolysin untersucht (**1 H, 2 H, 12 H**).

### 2.1.3 Rezeptor-medierte Aktivierung

Viele Wirtszellen, einschließlich Endothelzellen, erkennen die Anwesenheit von Mikroorganismen durch nicht-klonale Rezeptoren, die spezifisch für konservierte molekulare Muster sind (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) (4;218). PAMPs repräsentieren molekulare Strukturen von Mikroorganismen, nicht aber von Säugetieren, wie z.B. Peptidoglykan oder Lipopolysaccharid (LPS). Die Erkennung solcher Strukturen ermöglicht dem natürlichen Immunsystem auf einfache Weise, zwischen „Selbst“ und „Fremd“ zu unterscheiden. Meist repräsentieren PAMPs Strukturen, die großen Gruppen von Mikroorganismen gemeinsam sind, wie beispielsweise bakterielle DNS mit unmethylierten CpG-Motiven (229). Letztlich führt diese Eigenschaft der PAMPs dazu, dass eine kleine Anzahl Keimbahn-kodierter Rezeptoren eine große Vielfalt von Mikroorganismen erkennen kann. Die Familie der Toll-artigen Rezeptoren (TLR), die derzeit 10 Mitglieder (TLR1-10) hat, spielt eine essentielle Rolle in der Erkennung mikrobieller Bestandteile (218). TLR1-10 konnten in Endothelzellen nachgewiesen werden (65). Interessanterweise war in atherosklerotischen Läsionen und nach proinflammatorischer Stimulation eine Hochregulation von TLR2 und 4 nachweisbar (65). Umgekehrt reduzierte Hypoxie die Expression von TLR4 (99). Obwohl diese Rezeptoren eine gewisse Spezifität aufweisen, binden sie häufig doch mehrere Liganden: Beispielsweise aktivierte neben dem LPS Gram-negativer Bakterien auch das Hitzeschock Protein 60 von Chlamydien (32) oder ein Fusions-Protein des *Respiratory Syncytial*-Virus TLR4 (92). Die Situation wird weiter kompliziert durch die Beobachtung, dass Zellen multiple TLRs in verschiedenen Kombinationen gleichzeitig nutzen, um verschiedene Aspekte einer Mikrobe simultan zu detektieren (218).

Im Gegensatz zu anderen Zellen besitzen Endothelzellen kein zellständiges CD14, sondern es wird ein Komplex aus LPS, löslichem CD14, TLR4 und dem

membranständigen Protein MD-2 benötigt, um das LPS Signal in die Zelle zu transduzieren (Abb. 4) (93).



**Abb. 4:** LPS führt zu TLR4 vermittelter Stimulation von Endothelzellen. Die Rekrutierung mehrerer Adaptorproteine an TLR4 aktiviert verschiedene Signalpfade der Endothelzellen (vereinfachte Darstellung).

Im Zytosol führt die Rekrutierung von verschiedenen Adaptorproteinen an TLR4 zur Aktivierung von weiteren, „downstream“ gelegenen Signalelementen. Diese beinhalten verschiedene Kinasen (z.B. Tyrosinkinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, MAPK) und u.a. den Transkriptionsfaktor „*Nuclear Factor-κB*“ (NF-κB) (218).

Die Komplexität der aktivierten Signalwege ist beträchtlich und es bestehen multiple Interaktionen zwischen einzelnen Wegen auf verschiedenen Ebenen. Die Identifikation der einzelnen beteiligten Komponenten und die Einordnung ihrer Bedeutung in das Geschehen wird wesentliche Grundlagen für die Etablierung rationaler Therapien von Infektionskrankheiten legen (247). Von großem Interesse ist die Klärung der Frage, ob Endothelzellen auf Besatz der TLRs mit einer weitgehend stereotypen Antwort (z.B. Rekrutierung von Granulozyten, Expression proinflammatorischer Zytokine) reagieren oder je nach Pathogen/Pathogenbestandteil eine eindeutig differenzierte Wirtsantwort erbringen können. Vor dem Hintergrund, dass das Repertoire an entdeckten, biologisch relevanten TLR Liganden ständig wächst und Endothelzellen mit nahezu jedem vorstellbaren TLR-Liganden in Kontakt kommen können, ist die intensive Untersuchung von TLR Funktion und Signaltransduktion dringlich.

Eigene Experimente adressierten die LPS-induzierte Aktivierung von Endothelzellen am Beispiel der Expression von Interleukin-8 (IL-8) und Cyclooxygenase (COX)-2 (**6 H, 9 H, 17 H**).

Insgesamt ist bereits der „oberflächliche“ Erstkontakt mit Pathogenen oder ihren Produkten in der Lage, tiefgreifende Veränderungen in der endothelialen Biologie hervorzurufen. Durch die besondere Lokalisation des Endothels ist die Vielfalt möglicher Interaktionen sehr groß. Auch bedingt diese, dass die Reaktionen des Endothels auf Stimulation neben lokalen häufig bedeutende systemische Wirkungen entfalten. Offensichtlich ist auch, dass eine Vielzahl von medizinisch relevanten Interaktionen bislang nur unzureichend erforscht ist.

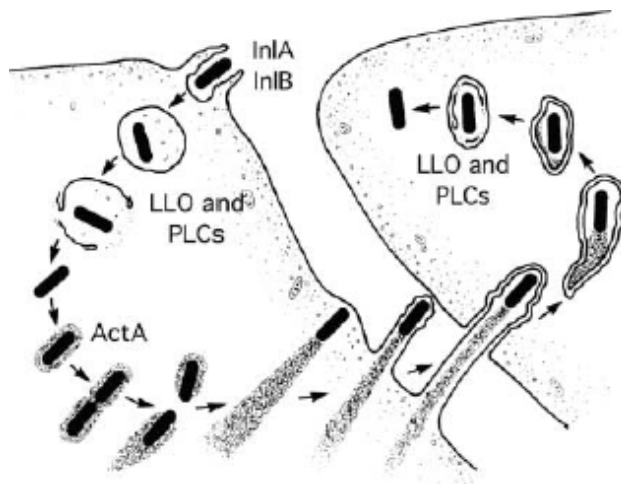
## 2.2 Invasion des Endothels

Obwohl nur wenige Bakterien, wie *Rickettsiae* (219), *B. henselae* (52;53), *C. pneumoniae* (204) und Listerien (224), im Endothel replizieren und persistieren, invadieren viele Bakterien [z.B. *Neisseria meningitidis* (149), *S. pneumoniae* (48)] transient Endothelzellen. Bakterien entwickelten eine große Vielfalt an hochdifferenzierten Mechanismen zur Invasion von Wirtszellen. Neben der Initiierung „konservativer“ Rezeptor-mediierter Endozytose ist eine wichtige Strategie die direkte Affektion des Zytoskeletts durch Proteine des Pathogens (8;43;200). Über die Induktion von Membranausstülpungen und -faltungen induzieren die Keime ihre Aufnahme. In der Zelle verbleiben die Pathogene in der Vakuole [z.B. Chlamydien (204)] oder erreichen frei das Zytosol [z.B. Listerien (224)]. Nahezu alle diese Mechanismen nutzen das Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen. Dabei sezernieren Bakterien Effektorproteine bereits extrazellulär, Gram-negative Bakterien injizieren Proteine per TTS, andere lysieren ihre Aufnahmevakuole durch Toxine. Besonders häufig konnte als Folge bakterieller Stimulation eine Modulation der Aktivität kleiner GTP-bindender Rho-Proteine mit subsequenter Manipulation des Zytoskeletts beobachtet werden (200). Intrazelluläre Replikation der Pathogene hat profunde Veränderungen des Metabolismus der Endothelzellen zu Folge. Ebenso mögen endotheliale Faktoren mit dem Metabolismus des Eindringlings interferieren.

Im Folgenden soll die Interaktion des Endothels mit Listerien, Chlamydien und Bartonellen, die in eigenen Arbeiten eine Rolle spielen, genauer betrachtet werden.

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes*, ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, ist ein opportunistisches Pathogen. Durch kontaminierte Lebensmittel übertragen, löst es bei Infektion insbesondere immungeschwächter Wirte, Schwangeren und Neugeborenen Septikämien und Meningitis aus (224). Listerien invadieren sowohl professionelle (z.B. Makrophagen) als auch nicht-professionelle (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten) Phagozyten. Der Infektionsprozess kann grob in die Schritte Adhäsion, Invasion, Flucht aus dem phagosomalen Kompartiment, intrazytosolische Replikation und Zell-zu-Zell Ausbreitung unterteilt werden (Abb. 5) (58;59;224).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Internalisation, Phagosomen-Lyse, Aktin-abhängigen Bewegung und Zell-Zell-Ausbreitung von Listerien (Inl, Internalin; LLO, Listeriolysin O; PLC, Phospholipase; ActA, Aktin bindendes Protein der Listerien). Abb. aus Ref. (166).

Die Adhäsion und Internalisation der Listerien ist wesentlich von listeriellen Internalinen abhängig: Internalin A förderte die Aufnahme durch Bindung an E-Cadherin, während Internalin B an die Met-Rezeptor Tyrosin Kinase band und via Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase den Transfer der Listerien in die Wirtszelle förderte (44;58;59;224). Darüber hinaus wird diskutiert, ob Listerien von infizierten Monozyten, die am Endothel adhären, in dieses übertreten können (59). Das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO) lysiert die phagosomale Vakuole und ermöglicht die „Flucht“ der Listerien ins Zytosol. Dort wirken die freigesetzten listeriellen Phospholipasen (PLC) (Phosphatidyl-Inositol spezifische PLC, PI-PLC; Phosphatidyl-Cholin spezifische PLC, PC-PLC) auf Signalwege der Wirtszelle ein (224) (**5 H**). Das Bakterium repliziert effizient im Zytosol von Endothelzellen. Es

polymerisiert Aktin der Wirtszelle mit Hilfe des listeriellen Proteins ActA und bewegt sich sowohl innerhalb einer Zelle als auch von Zelle zu Zelle mit Hilfe dieses Aktinvorschubs, der eine komplexe und faszinierende Interaktion zwischen Pathogen und Wirtszelle darstellt (34;46;158). Infektion von Endothelzellen mit Listerien führt zu einer komplexen proinflammatorischen Aktivierung des Endothels, insbesondere durch NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription: Sowohl die Expression von Zytokinen, Chemokinen als auch Adhäsionsmolekülen wurde durch Listerien gesteigert (45;58) **(4 H, 5 H)**.

Eigene Untersuchungen unter Einsatz verschiedener listerieller Deletionsmutanten beschreiben die Adhäsionsmolekül-Expression und adressieren die Leukozyten-Endothel-Interaktion in Listerien-infizierten Endothelzellen. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die listeriellen PLC über die Bildung von Zeramiden in die Regulation NF- $\kappa$ B-induzierter Genexpression eingreifen **(4 H, 5 H)**.

### **2.2.2 *Chlamydia pneumoniae***

*C. pneumoniae*, ein Gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, ist ein häufiger Erreger respiratorischer Infektionen (Bronchitis, Pneumonie) sowie von Pharyngitis und Sinusitis (90;165). Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob *C. pneumoniae*-Infektion (des Endothels) durch die Förderung inflammatorischer Reaktionen zur Ausbildung vaskulärer Läsionen und subsequenter Arteriosklerose beiträgt (61;128). *C. pneumoniae* invadiert und repliziert in Endothelzellen ebenso wie in professionellen Phagozyten (z.B. Monozyten, Makrophagen) (204).

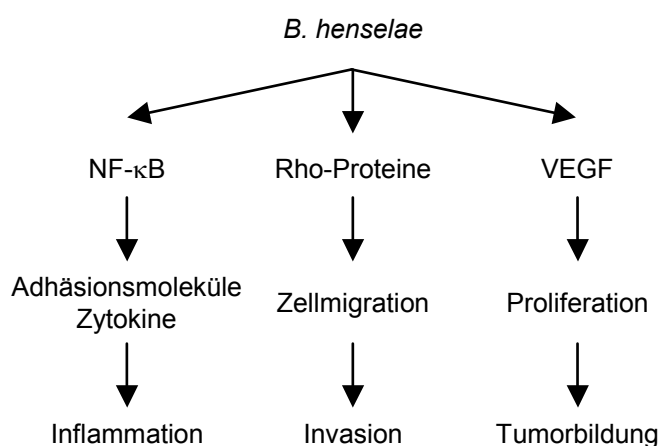
Obwohl die unterliegenden Mechanismen weitgehend unbewiesen sind, wird angenommen, dass Chlamydien über die Infektion von Monozyten bzw. kurze Phasen der Bakteriämie im Rahmen pulmonaler Infektionen Zugang zum Endothel erhalten. Durch die Induktion von Phagozytose gelangen infektiöse chlamydiale Elementarkörperchen in Zielzellen. Innerhalb weniger Minuten nach Aufnahme beginnt die Entwicklung metabolisch aktiver Retikularkörperchen (204). Die Chlamydien rekrutieren über im Detail unbekannte Mechanismen Lipide der Wirtszelle (z.B. Sphingomyelin, Cholesterol) zur chlamydialen Inklusion und replizieren effizient in den infizierten Wirtszellen (222;238). Infektion von Zielzellen führte zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Chemokin- und Wachstumsfaktorbildung sowie prokoagulatorischer Aktivierung. Obwohl Chlamydien

eine wesentliche Bedeutung als (endotheliales) Pathogen zukommt, ist wenig über molekulare Mechanismen der Zell-Interaktion bekannt. Beispielsweise legen Genom- und Proteomanalysen die Existenz eines funktionellen Typ 3-Sekretionsapparates der Bakterien nahe (144;223), dessen Bedeutung ist jedoch noch nicht erarbeitet.

Eigene Untersuchungen galten der Interaktion von Leukozyten mit *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen und analysierten die Bedeutung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen Aktivierung durch das Bakterium (**8 H, 19 H**).

### 2.2.3 *Bartonella henselae*

Das Gram-negative Bakterium *B. henselae* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das Zoonosen in Menschen und Katzen auslöst (115). Asymptomatisch infizierte Katzen übertragen über Biss- und Kratzwunden ebenso wie Katzenflöhe durch Bisse das Pathogen auf den Menschen. Insbesondere immungeschwächte Patienten können an Katzenkratzkrankheit, bazillärer Angiomatose oder bazillärer Peliose erkranken (116). Angioproliferative Läsionen, in denen aktive, proliferierende, atypische Endothelzellen mit Befall von *B. henselae* nachweisbar sind, stellen typische histopathologische Merkmale der bazillären Angiomatose und Peliose dar (52).



**Abb. 6:** *B. henselae* Infektion von Endothelzellen resultiert in einer komplexen proinflammatorischen und proangiogenetischen Stimulation der Zellen.

Neben einer, ähnlich zu anderen Bakterien verlaufenden, endozytotischen und Zytoskelett-abhängigen Aufnahme von *B. henselae* scheint ein besonderer Mechanismus der zellulären Invasion zu bestehen: Nach initialem Kontakt zwischen Pathogen und Endothelzelle kommt es innerhalb von Stunden zur Zytoskelett-medierten Akkumulation der Bakterien auf der Oberfläche des Endothels. Dieses

bakterielle Agglomerat wird dann in Form des sog. Invasoms in toto innerhalb von ca. 24 h in die Zelle aufgenommen (54). Neben Aktin-abhängigen werden Tyrosinkinasen-vermittelte Effekte als wesentlich für die Ausbildung des Invasoms angesehen (53;54). Dabei ist noch unklar, welche Rolle bakteriellen Pili oder Membranproteinen zukommt. Die Invasion führt offensichtlich zur Expression spezieller Genprodukte in den Bartonellen, deren Funktion für den Verlauf der Interaktion unbekannt ist (110).

Infektion von Endothelzellen mit *B. henselae* prägt einen proangiogenetischen und proinflammatorischen Phänotyp des Endothels, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen erst teilweise untersucht sind (Abb. 6). Insbesondere die wohl einzigartige Induktion von Angiogenese durch ein bakterielles Pathogen bietet interessante Forschungsansätze (52;53).

Eigene Experimente erbrachten Beiträge zum Verständnis der *B. henselae*-induzierten Signaltransduktion in Endothelzellen, subsequent erhöhter Leukozyten-Endothel-Interaktion und identifizierten ein Membranprotein der Bartonellen als potentiellen Pathogenitätsfaktor (**10 H**).

## 2.3 Das Endothel in der Wirtsantwort

Eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Pathogene und deren Produkte wirken über verschiedenste Pathomechanismen auf das Endothel ein. Einige stereotype, in ihrer deutlichen Mehrzahl proinflammatorische Antworten der Zelle auf Pathogen-induzierte Stimulation wurden identifiziert. Neben der direkten, Pathogen-assoziierten Aktivierung spielt die „unspezifische“ Stimulation der Endothelzellen durch Produkte der Wirtsantwort eine wesentliche Rolle für das entzündliche Geschehen. Im Rahmen mancher hämorrhagischer Fieber oder akuten Phasen der systemischen, überbordenden, proinflammatorischen Wirtsantwort (z.B. Sepsis) wird gar postuliert, dass die quasi sekundäre Perturbation des Endothels entscheidend für den Verlauf der Erkrankung sein kann (161;228). Zusätzlich trägt das Endothel durch Liberierung proinflammatorischer Substanzen, Rekrutierung von Entzündungszellen, prokoagulatorische Aktivität und endotheliale Hyperpermeabilität wesentlich zur Aggravation der Entzündung bei.



Im Folgenden soll im Überblick auf wesentliche und neue Aspekte dieses Zusammenspiels eingegangen werden. Dabei wird auf für das Verständnis eigener Arbeiten Notwendiges fokussiert.

### 2.3.1 Stimulation des Endothels

Auf Stimulation mit Pathogenen oder deren Bestandteilen (z.B. LPS, Lipoteichonsäure) oder von diesen liberierten Substanzen (z.B. Exotoxine) reagiert das Endothel mit der Produktion einer Vielzahl von meist proentzündlichen Zytokinen und Chemokinen (89). Diese können, sezerniert in den Blutstrom, zur systemischen Aktivierung des Organismus beitragen, oder, bei basolateraler Sekretion, in erster Linie lokale Prozesse beeinflussen. Die chemotaktische Rekrutierung von Entzündungszellen durch diese Produkte trägt wesentlich zur effektiven lokalen Bekämpfung von Pathogenen bei (148). Andererseits kann eine unangemessen starke und/oder andauernde Aktivierung zu erheblichen, teils chronischen Schäden betroffener Gewebe führen.

Neben sezernierten Zytokinen wird zunehmend die Bedeutung parakriner „Eigenstimulation“ des Endothels erkannt: Beispielsweise wird ein großer Teil des von Endothelzellen nach inflammatorischer Stimulation gebildeten Tumor Nekrose Faktors- $\alpha$  (TNF) nicht sezerniert bzw. durch Proteolyse von der endothelialen Oberfläche in den Blutstrom abgespalten, sondern verbleibt als membranständiges, transmembranöses TNF (tmTNF) auf der Oberfläche des Endothels (169).

Durch die Produktion vasoaktiver Substanzen nimmt das Endothel bedeutenden Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks: Während Endothelin-1 ein potenter Vasokonstriktor ist, dilatieren  $\text{PGI}_2$  und NO Blutgefäße. Die Produktion dieser Mediatoren durch das Endothel wird von inflammatorischen Substanzen stark stimuliert: So induzierten Poren-bildende bakterielle Exotoxine wie *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin und *E. coli* HlyA die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Liberierung von NO durch die NO-Synthase (NOS)-1 (205;206;210). Exposition von Endothelzellen gegenüber LPS oder TNF führte zur Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger NOS-2 und subsequenter Freisetzung großer Mengen an NO (112). Neben des gefäßdilatierenden Effektes können diese großen NO-Mengen zur Abtötung von Bakterien beitragen.

Aktuelle Studien weisen auf eine zentrale Rolle des vasodilatierenden Peptides Adrenomedullin (ADM) in der systemischen Inflammation hin (231;232): ADM wird

von proinflammatorisch stimulierten Endothelzellen freigesetzt (100) und scheint eine wesentliche Rolle für den Übergang von der hyperdynamischen zu hypodynamischen Phase der Sepsis zu spielen (117;231). Darüber hinaus waren Mäuse, die ADM in ihrem Gefäßsystem überexprimierten, resistent gegenüber einem Endotoxin-Schock (194). Die Bedeutung des ADM für die Regulation des Endothels und der Gefäßfunktion wird weiterhin durch eine Studie mit ADM-„knock-out“ Mäusen unterstrichen (37): Diese Tiere verstarben *in utero* mit massiver Ödembildung und Gefäßmißbildungen. Eigene Untersuchungen demonstrierten eine Barriere-protective Funktion von ADM gegenüber inflammatorischen Stimuli (**12 H**).

Endothelzellen verlieren nach proinflammatorischer Stimulation ihre antikoagulatorische Funktion und verstärken die Blutgerinnung. Beispielsweise verloren Endothelzellen Thrombomodulin und Heparan Sulfat von der Zelloberfläche und exprimierten verstärkt Gewebsfaktor (130;204). Erhöhte Expression von Gewebsfaktor durch das Pathogen-aktivierte Endothel, adhätierende, mit Gewebsfaktor beladene Monozyten und leukozytäre Mikropartikel können im Konzert die Gerinnungskaskade aktivieren (142). Schließlich aktiviert die Serin-Protease Thrombin den G-Protein gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptor-1 der Endothelzellen und verstärkt damit endotheliale Antworten wie Hyperpermeabilität, Adhäsionsmolekül-Expression und Zytokinproduktion (47).

Neben den beschriebenen Faktoren tragen z.B. die Rekrutierung der Komplement-Kaskade, nervale Faktoren und physikalische Reize (Blutdruck, Änderung der Blutströmung, u.s.w.) zur Aktivierung bei.

Insgesamt wird deutlich, dass komplexe, miteinander verwobene Kreisläufe der gegenseitigen Stimulation, Reaktion und Aktion in der Entzündung ablaufen, die kaum in einem linearen Text zu beschreiben sind. Dabei reagieren alle beteiligten Partner aufeinander und es ist schwierig abzuschätzen, wer den Verlauf der Reaktion letztlich bestimmt.

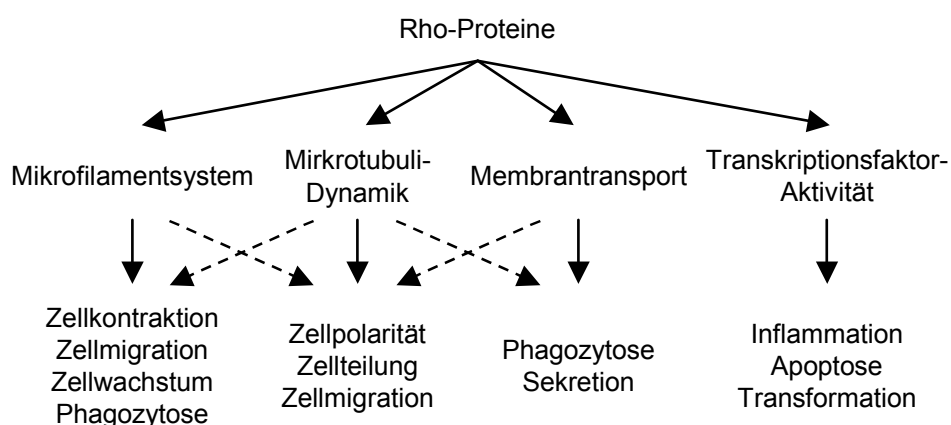
Eigene Untersuchungen fokussierten auf den Einfluss der Aktivierung der Rho-Proteine, der p38 MAPK und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B auf die Entzündungsreaktion. Darüber hinaus wurde die Rekrutierung von Entzündungszellen sowie die Regulation der endothelialen Barrierefunktion genauer analysiert.

### 2.3.2 Proinflammatorische Signaltransduktion in Endothelzellen

Die vielen unterschiedlichen Pathomechanismen von Pathogenen und Produkten der Wirtsantwort induzieren komplexe Signaltransduktionswege in Endothelzellen, die erst fragmentarisch bekannt sind. Auffällig ist, dass endogene proinflammatorische Substanzen, intakte Bakterien und pathogene Produkte teilweise gleiche Signalwege aktivieren (z.B. MAP-Kinasen). Unter der Aktivierung verschiedener Rezeptoren, Kinasen und Phosphatasen kommt es zur Änderung der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren. NF- $\kappa$ B trägt zur Ausbildung eines proinflammatorischen Phänotypes des Endothels nachhaltig bei (51). Dabei zeigte sich, dass kleine GTP-bindende Rho-Proteine als wesentliche Schaltmoleküle wirken (**3 H, 6 H, 9 H, 13 H, 17 H**).

#### 2.3.2.1 Kleine GTP-bindende Rho-Proteine

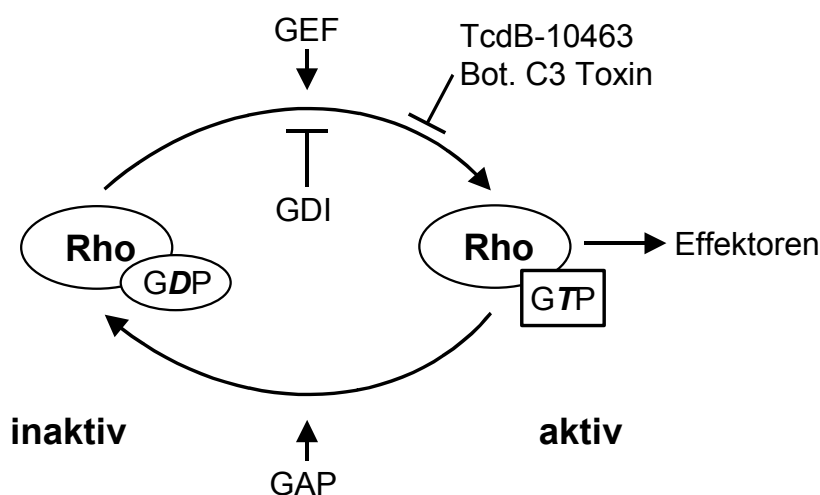
Rho-Proteine sind Mitglieder der Ras-Superfamilie monomerer, kleiner GTP-bindender Proteine (213). Initial wurden sie als zentrale Regulatoren des Mikrofilamentsystems beschrieben. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass sie als molekulare Schalter auch andere bedeutende Zellfunktionen steuern (Abb. 7) (114;213).



**Abb. 7:** Als zentrale Schaltmoleküle beeinflussen Rho-Proteine wichtige Zell- und Gewebefunktionen. Interaktionen zwischen verschiedenen Rho-Proteinen als auch Rho-Protein-abhängigen Signalwegen führen zu komplexen, nur teilweise voneinander abgrenzbaren Signalpfaden.

Die Vielfalt der Erkrankungen, mit denen diese GTP-bindenden Proteine verknüpft werden, betont die grundlegende Bedeutung der Rho-Proteine als molekulare Schaltstellen (21): Beispielsweise tragen Proteine der Rho-Familie wesentlich zur malignen Transformation bei, werden mit X-chromosomal vererbter mentaler Retardierung in Verbindung gebracht und sind an der Regulation des Blutdrucks maßgeblich beteiligt. Von wesentlicher Bedeutung war die Beobachtung, dass verschiedenste bakterielle Effektoren die Funktion von Rho-Proteinen manipulieren (5;6;24;103-105). Neben Prozessen der bakteriellen Adhäsion und Invasion haben eine Vielzahl von bakteriellen Toxinen Rho-GTPasen zum Ziel. Der Einsatz eines Teils dieser Gifte als hochspezifische molekulare Werkzeuge erbrachte neue Einblicke in die Funktion der GTPasen (12;103).

Rho-Proteine sind Guanin-Nukleotid bindende Proteine, die zwischen einem aktiven GTP-gebundenem und einem GDP-gebundenem, inaktivem Zustand wechseln (Abb. 8) (213).



**Abb. 8:** Regulation kleiner GTP-binder Proteine durch bakterielle Toxine (TcdB-10643, bot. C3-Toxin) und regulatorische Proteine.

In inaktivem Zustand sind Rho-GTPasen an negative Regulatoren (Rho GDP Dissoziations-Inhibitoren, GDIs), welche die GDP-Bindung stabilisieren und die Sequestrierung im Zytosol verstärken, gebunden. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) führen durch erhöhte Aktivität der intrinsischen GTPase ebenfalls zur

Inhibition der Rho-Proteine. Umgekehrt tragen positive Regulatoren wie GDP/GTP Austauschfaktoren (GEFs) zur Aktivierung der Schaltmoleküle bei. Dabei gibt es jeweils mehrere dieser Proteine für die einzelnen GTPasen mit verschiedener Spezifität für die jeweiligen Ziel-GTPasen (79). Die unterschiedliche Expression dieser Regulatoren in einzelnen Zelltypen und die Beobachtung, dass die kleinen Proteine selbst wiederum reguliert werden, verdeutlicht die enge und äußerst komplexe Steuerung der Rho-GTPasen. Zusätzlich erschwert werden grundlegende (und verallgemeinernde) Aussagen durch die Tatsache, dass Rho-abhängige Effekte zwischen einzelnen Zelltypen stark variieren und die Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen von einem Zell- oder Gewebetyp auf einen anderen praktisch nicht möglich ist (213).

Besonders gut untersucht wurde die Rolle von RhoA („*Ras homologous member 1*“), Rac1 („*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*“) und Cdc42 („*cell division cycle 42*“).

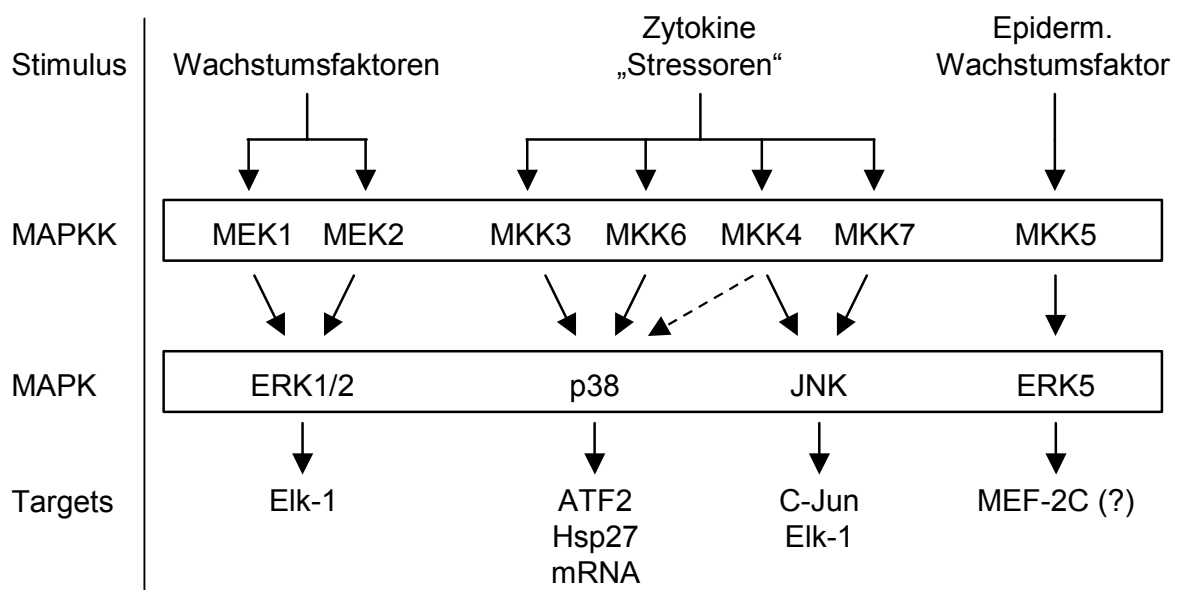
Obwohl Transfektionsversuche mit aktiven und inaktiven Mutanten der Rho-Proteine wesentlich zum Verständnis ihrer Funktion beitrugen, limitierte insbesondere die hohe Toxizität inaktiver Mutanten in primären Zellkulturen viele Analysen (213). Die Beobachtung, dass clostridiale Zytotoxine mit hoher Spezifität Rho-Proteine kovalent modifizieren und dadurch aktivieren/blockieren, ermöglichte die gezielte Untersuchung in nicht-transfizierten Zellen (5;6;103-105). *Clostridium difficile* Toxin B (TcdB)-10463 blockiert die Aktivität von RhoA, Rac1 und Cdc42 durch Monoglucosylierung an Aminosäure Threonin 35 (RhoA) und 37 (Rac1, Cdc42). TcdB-1470 inaktiviert Rac1 und Cdc42, jedoch nicht RhoA. Im Gegensatz dazu hat *C. sordellii* lethale Toxin (TcsL-1522) primär Ras als Zielmolekül. Klinisch betrachtet sind TcdB-10463 und TcdB-1470 kausal an der durch *C. difficile* verursachten, Antibiotika-assoziierten Kolitis beteiligt, während TcsL-1522 ein Virulenzfaktor für die Ausbildung eines Gasgangräs darstellt. Die Isoformen RhoA, RhoB und RhoC blockiert *C. botulinum* C3 Toxin durch ADP-Ribosylierung an Asparagin 41. Mit großem Erfolg setzt man diese Toxine zur Analyse der funktionellen Bedeutung kleiner GTPasen der Rho-Familie ein (103).

Verschiedene Studien wiesen darauf hin, dass Rho-Proteine an der Aktivierung des (proinflammatorischen) Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B teilhaben (145;146;160). Eigene Untersuchungen hatten daher zum Ziel, die Rolle von Rho-Proteinen in der

inflammatorischen Aktivierung von Endothelzellen näher zu untersuchen (**6 H, 9 H, 13 H, 17 H**).

### 2.3.2.2 p38 Mitogen-aktivierte Protein Kinase

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind wichtige, hochkonservierte Signaltransduzierende Enzyme in Eukaryonten (39;57;120). Neben der Rezeptor-vermittelten Zellaktivierung sind sie auch durch physikalische und chemische Reize aktivierbar und ermöglichen dadurch eine schnelle Adaptation der Zellen an wechselnde Stressoren (Abb. 9). MAPK sind Teil dreistufiger Kinasenkaskaden bestehend aus MAPK, MAPK Kinase (MAPKK) und MAPK Kinasen Kinasen (MAPKKK).



**Abb. 9:** Kinasenkaskaden der MAPK. Von besonderer Bedeutung für die Regulation inflammatorischer Prozesse ist die p38 MAPK.

Dabei werden die „extracellular signal-regulated protein“ Kinasen (ERK), die c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinasen (JNK) und p38 MAP Kinasen voneinander unterschieden (39;57;120). Es muss jedoch betont werden, dass - obwohl oft als parallele Signalwege dargestellt - multiple Interaktionen auf verschiedenen Ebenen zwischen den Kinasenkaskaden bestehen. Darüber hinaus gibt es jeweils zahlreiche

Isoenzyme innerhalb der einzelnen Familien (z.B. p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ 1/2, p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ ), deren jeweilige Funktion im Detail häufig noch unbekannt ist (120). In der Adaptation von Endothelzellen auf proinflammatorische Umweltreize spielt die p38 MAP Kinase eine besondere Rolle.

Der Einsatz spezifischer p38 MAP Kinase Inhibitoren reduzierte akute Inflammation, Sepsis und arthritische Veränderungen in verschiedenen Tiermodellen (120). In ersten klinischen Versuchen konnten bei Menschen antiinflammatorische Effekte durch Hemmstoffe der p38 MAP Kinase bei geringen Nebenwirkungen nachgewiesen werden (25;95).

Die proximalen, die p38 MAP Kinase aktivierenden Signalelemente sind noch weitgehend unerforscht: Drei Mitglieder der MAPK Kinasen (MKK)-Superfamilie, MKK3, 4 und 6, stimulierten nach Überexpression die p38 MAPK, welche wiederum downstream gelegene Kinasen wie die „*MAPK-associated kinases*“ 2/3 (MAPKAP-kinases2/3) oder 3pK-Kinase aktivierte (57;120). Experimente in Mäusen, in denen durch eine gezielte Mutation der MAPKAP Kinase 2 ein Teil des p38 MAPK-Signalwegs blockiert wurde, zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber einem Endotoxin-Schock bei einer zu ca. 90% reduzierten Bildung von TNF $\alpha$ , was gut mit der beobachteten protektiven Wirkung der p38 MAP Kinasen Inhibitoren übereinstimmt (118).

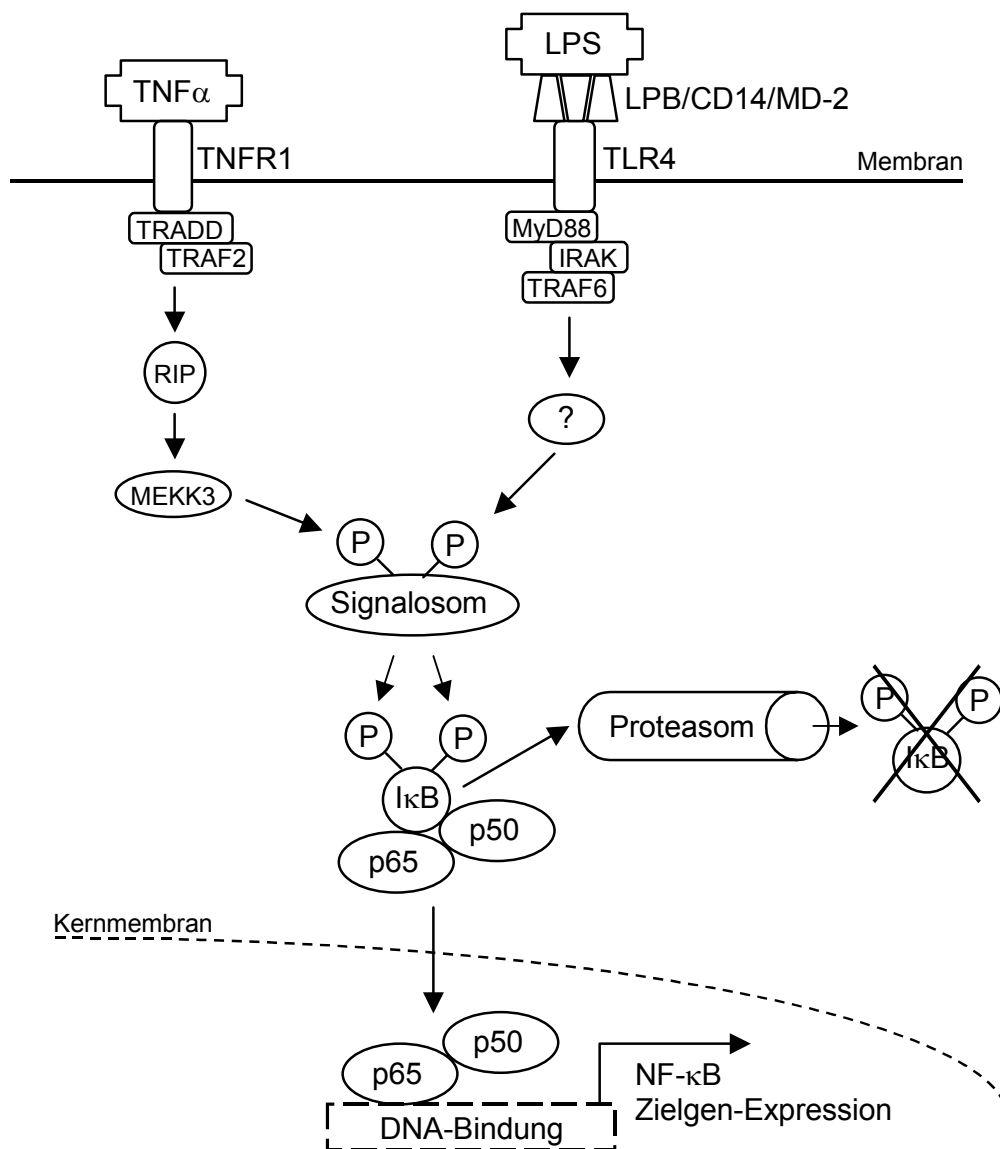
Neben den akut-inflammatorischen Signalwegen kommt den p38 MAP Kinasen eine wesentliche Rolle in der Regulation VEGF-abhängiger angiogenetischer Prozesse zu (139;242). Offenbar sind proinflammatorische Zytokinexpression, Proliferation, Migration und Permeabilität in hohem Maße durch p38 MAP Kinasen abhängige Prozesse gesteuert.

Vor diesem Hintergrund analysierten wir in unseren Experimenten die Bedeutung der p38 MAP Kinase in der Endotoxin (**9 H**)- und VEGF (**11 H**, **15 H**)-induzierten Signaltransduktion in Endothelzellen.

### **2.3.2.3 Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B**

Viele unterschiedliche (proinflammatorische) Signalwege konvergieren in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B (133;215). Neben Bakterien und bakteriellen Produkten, Viren, Zytokinen wie IL-1 $\beta$  oder TNF haben auch chemische und physikalische Reize in verschiedenen Zelltypen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Folge. Nach Translokation

in den Zellkern beeinflusst der Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene in Endothelzellen, u.a. von Chemo- und Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Enzymen (z.B. COX-2, induzierbare NOS) und anti-Apoptose Molekülen (51;136;235). NF- $\kappa$ B ist Mitglied der Rel-Familie der Transkriptionsfaktoren, die inaktiv im Zytosol vorliegen und nach Aktivierung in den Nukleus translozieren (Abb. 10) (82;226).



**Abb. 10:** Nach Phosphorylierung durch das Signalosom und Degradation durch das Proteasom von I $\kappa$ B transloziert NF- $\kappa$ B in den Nukleus.

Die aktive Form von NF- $\kappa$ B besteht aus zwei variablen Untereinheiten, z.B. klassischerweise dem Heterodimer p50/p65.



In ruhenden Endothelzellen liegt NF- $\kappa$ B inaktiv in komplexierter Form im Zytosol vor. Die Assoziierung mit Inhibitorproteinen der I $\kappa$ B-Familie (z.B. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ ) sequestriert den Transkriptionsfaktor im Zytosol (140). Dabei kontrollieren die verschiedenen I $\kappa$ Bs NF- $\kappa$ B auf unterschiedliche Weise. I $\kappa$ B $\alpha$  wird nach Zellstimulation schnell, aber nur für eine begrenzte Zeit, degradiert. Die NF- $\kappa$ B-abhängige Neubildung von I $\kappa$ B $\alpha$  kann durch negative Rückkopplung eine Terminierung der NF- $\kappa$ B Aktivität erzielen (140). Im Gegensatz dazu ist z.B. die Expression von I $\kappa$ B $\beta$  nicht durch NF- $\kappa$ B kontrolliert, wodurch eine persistierende Aktivierung von NF- $\kappa$ B erreicht werden kann (140).

Wenngleich mehrere, bislang teils unbekannte Wege zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen, ist die Aktivierung des sogenannten NF- $\kappa$ B-Signalosoms von zentraler Bedeutung für die Regulation des Transkriptionsfaktors unter proinflammatorischen Bedingungen (101;192): Das Signalosom, u.a. bestehend aus der „*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*“ (NIK) sowie den I $\kappa$ B Kinasen (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ) phosphoryliert I $\kappa$ B im I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B Komplex an kritischen Serinresten. Die Phosphorylierung leitet eine Konformationsänderung der Inhibitoren ein, welche N-terminale Lysine als Substrat für eine Ubiquitinierung demaskiert. Proteolytische Degradierung der ubiquitinierten I $\kappa$ B Moleküle durch das 26 S-Proteasom legt die Kernlokalisierungssequenz des Transkriptionsfaktors frei (214). Im Zellkern interagiert NF- $\kappa$ B mit dekameren Konsensus-Sequenzen innerhalb der Promotorenregion unterschiedlichster Gene. Diese innerhalb weniger Minuten ablaufende Aktivierung eines Transkriptionsfaktors erlaubt die rasche Reaktion der Zelle auf verschiedenste Stimuli mit der sofortigen Expression von „Akut-Phase-Genen“ („*early response genes*“), die insbesondere in der Frühphase von Infektionen von wesentlicher Bedeutung sind (51;233).

Zusammenfassend initiieren verschiedenste proinflammatorische Stimuli bislang erst fragmentarisch bekannte Signalwege im Endothel, die schrittweise die verschiedenen, meist pro-entzündlichen Veränderungen des Endothels bewirken und damit die Entzündungsreaktion entscheidend mit prägen. Besondere Bedeutung kommt dabei der Rekrutierung von Entzündungszellen durch die Expression von Adhäsionsmolekülen durch das Endothel und dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion zu. Die Darstellung wesentlicher Grundlagen beider Mechanismen im Bezug auf eigenen Arbeiten ist Gegenstand des folgenden Kapitels (2.3.3).

### 2.3.3 Rekrutierung von Entzündungszellen

Neben humoralen Faktoren wie dem Komplementsystem und Proteasen beruht die Zerstörung von Pathogenen in der Frühphase von Infektionen auf phagozytierenden Zellen. Diese ersten und weitgehend unspezifischen Immunreaktionen sind von zentraler Bedeutung für die Bekämpfung von Pathogenen, da eine vollständige, optimierte Aktivierung von T- und B-Lymphozyten mehrere Tage beanspruchen kann. Die Wanderung von Leukozyten beim Verlassen der Gefäße wird durch ihre Bindung an vaskuläre Endothelzellen gesteuert. Dabei interagieren verschiedene Rezeptor-Ligandenpaare auf den beteiligten Zellen. Unter einer reversiblen, niedrigaffinen Bindung der Leukozyten an die Oberfläche des Endothels rollen sie auf der Oberfläche des Endothels entlang („*Rolling*“), gefolgt von festem Adhären ( „*Adhesion*“) und der Transmigration in subendotheliale Gewebe („*Transmigration*“) (83;240). Im Folgenden wird detaillierter auf polymorphkernige Granulozyten (PMN) sowie leukozytäre und endotheliale Adhäsionsmoleküle eingegangen.

#### 2.3.3.1 Leukozytäre Liganden

Neben der Zell-Zell Interaktion erfüllen Integrine wichtige Funktionen in der Zell-Matrix Interaktion. Integrine sind eine Familie heterogener Glykoproteine und setzen sich aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammen. Unter der Rekrutierung eines komplexen Arrangements von Proteinen und Kinasen sind Integrine mit dem Zytoskelett verbunden und nehmen an dynamischen Prozessen, wie der Zellmigration, teil (98). Anhand der  $\beta$ -Kette erfolgt die Einteilung der Integrine in Gruppen:  $\beta_1$  (CD29)-,  $\beta_2$  (CD18)- und  $\beta_3$  (CD61)-Integrine sind von besonderer Bedeutung für entzündliche Prozesse. Auf ruhenden Leukozyten sind z.B. Mac-1 (CD11b/CD18) und LFA-1 (CD11a/CD18) schwach exprimiert. Nach Stimulation werden die in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Moleküle rasch auf der Zelloberfläche exponiert und können mit ICAM-1 auf Endothelzellen interagieren (129).

Auf der Oberfläche nahezu aller Leukozyten konnte das fukosylierte Tetrasaccharid SLe<sup>x</sup> nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten P-Selektin-Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und Lewis X (Le<sup>x</sup>) als Liganden der Lektindomäne endothelialer Selektine identifiziert werden (102).

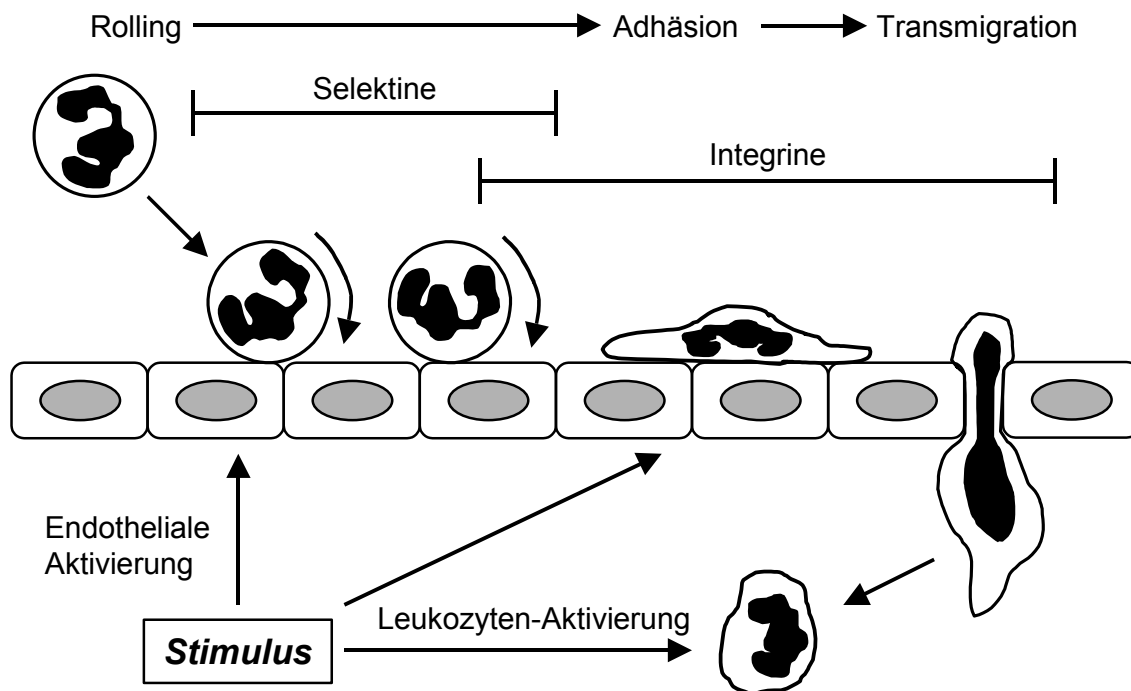
### 2.3.3.2 Rollen, Adhärenzen und Transmigrieren von PMN

Obwohl insbesondere kapilläre und venöse Endothelzellen ständig mit Leukozyten in Kontakt kommen, findet keine dauerhafte Interaktion oder Aktivierung der „kollidierenden“ Zellen statt. Bei proinflammatorischer Aktivierung der Endothelzellen (und/oder Granulozyten) können Granulozyten jedoch gezielt „abgebremst“ werden. Ruckartig, teils von Endothel- zu Endothelzelle, gleiten und rollen die Granulozyten über das Endothel (Abb. 11) (83;131;179). Auf Seiten der Granulozyten ist auf der Spitze von Mikrovilli exponiertes L-Selektin an diesem Rollen maßgeblich beteiligt, auf Seiten des Endothels die transiente Expression von P-Selektin (143;216). Schließlich führt die Expression von E-Selektin auf der Endotheloberfläche zum Abbremsen und finalen Adhärenzen der Granulozyten (123).

Neben E-Selektin trägt die endotheliale Expression von ICAM-1 maßgeblich zur Adhäsion bei. Die Bindung von leukozytären  $\beta_2$ -Integrinen an ICAM-1 führt ihrerseits über die Induktion verstärkter  $\beta_2$ -Integrinexpression auf Granulozyten zur Festigung der Interaktion (123). Insbesondere bei Monozyten kann neben diesen Faktoren die Bindung von leukozytären  $\beta_1$ -Integrinen an endotheliales VCAM-1 zur Adhäsion beitragen (171).

Zusätzlich zu den „primären“ Adhäsionsmolekülen wirken weitere Faktoren, wie z.B. die Expression von endotheliale Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) (245) oder IL-8 (180), maßgeblich an der Adhäsion mit.

Im Anschluss wandern die Granulozyten zwischen den Endothelzellen durch die endotheliale Basalmembran. Die dabei auftretenden Interaktionen zwischen dem Zytoskelett der beteiligten Zellen und die Bedeutung von z.B. der Adhäsion an Matrixbestandteile ist äußerst komplex und erst ansatzweise verstanden (227).



**Abb. 11:** Das Rollen, Adhären und Transmigrieren von Granulozyten an/durch das Endothel ist wesentlich durch die koordinierte Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen gesteuert.

### 2.3.3.3 Endotheliale Adhäsionsmoleküle

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse steuert die kontrollierte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wesentliche Anteile der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Dabei kommt dem zeitlichen Verlauf der Expression der beteiligten Moleküle entscheidende Bedeutung zu. Im Folgenden wird auf die in eigenen Arbeiten untersuchten Reaktionspartner fokussiert [Selektine, Integrine, Mitglieder der Immunglobulin (Ig)-Super-Gen-Familie]. Neben diesen wurden weitere potentiell bedeutende Interaktionspartner wie CD99 identifiziert (183). Insbesondere weisen aktuelle Arbeiten auf eine wichtige Funktion endothelialer junctionaler Proteine (z.B. JAM-1, VE-Cadherin) im Rahmen des Transmigrationsprozesses hin (227).

#### 2.3.3.4 Selektine

Endothelzellen können P- und E-Selektin auf der Zelloberfläche exprimieren (106;132). Auf ihrer extrazellulären Domäne weisen beide Moleküle eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige c-Typ Lektin-Domäne auf, die spezifisch an Kohlenhydrat-Seitenketten ihrer Liganden bindet. Zur Identifikation von Zielzellen dient eine „*epithelial growth factor*“ (EGF)-Domäne. Daneben finden sich eine variable Anzahl kurzer „Konsensus-Sequenzen“. Intrazellulär ist an die Transmembrandomäne der Moleküle ein kurzer zytoplasmatischer Bereich angeschlossen, der u.a. potentielle Phosphorylierungsstellen enthält (106;131).

P-Selektin wird präformiert in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und innerhalb von Minuten nach Stimulation an der Oberfläche präsentiert (23). Das Molekül ist nur für 5-15 min auf der Zelloberfläche nachweisbar, dann wird es durch endozytotische Wiederaufnahme und/oder proteolytische Spaltung entfernt. P-Selektin vermittelt in der Interaktion mit granulozytärem L-Selektin die lockere Assoziation und das Rollen von PMN, Monozyten und Lymphozyten an aktivierte Endothelzellen (143).

E-Selektin wird erst nach ca. vierständiger proinflammatorischer Stimulation maximal auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu P-Selektin wird E-Selektin unter der Kontrolle von u.a. dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B transkriptionell reguliert. Daher spielt E-Selektin in späteren Phasen der Entzündung eine wichtige Rolle (1;124). Granulozyten erfahren durch die Bindung von endothelialen Selektinen an ihren L-Selektin assoziierten Liganden  $\text{SLe}^x$  eine zusätzliche Aktivierung. Bedingt durch die abflauende Selektin-Transkriptionsrate, die mRNA-Halbwertszeit sowie Proteolyse des exprimierten Proteins wird ca. 10-15 h nach Stimulation wieder eine basale Oberflächenexpression erreicht (15;81;123).

Obwohl Experimente mit Hilfe P- oder E-Selektin blockierender Antikörper eine wirksame Blockade der Leukozytenaktivierung *in vitro* und *in vivo* zeigten und die physiologische Rolle dieser Moleküle für die Rekrutierung der Entzündungszellen akzeptiert ist, scheint eine erhebliche Redundanz der Adhäsionsmoleküle zu bestehen (29): Experimente mit P- und E-Selektin-defizienten Mäusen zeigten zwar eine reduzierte Sterblichkeit in Peritonitismodellen, jedoch nur teilweise Effekte auf die Rekrutierung der Entzündungszellen zum Ort des Geschehens (30;31).

### 2.3.3.5 Immunglobulin-Superfamilie

Die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind durch charakteristische Ig-Domänen von 70-120 Aminosäuren Länge und eine typische räumliche Struktur charakterisiert.

CD 54 (ICAM-1) wird neben Endothelzellen auf anderen residenten Zellen (z.B. Epithelzellen, Fibroblasten) und Leukozyten nachgewiesen (97). Wie E-Selektin ist ICAM-1 auf ruhenden Zellen gering exprimiert und wird nach proinflammatorischer Stimulation der Endothelzellen transkriptionell hochreguliert. Die in wesentlichen Anteilen NF- $\kappa$ B abhängige Expressionssteigerung erreicht - abhängig vom Stimulus - nach ca. 18-24 h ihr Maximum (125). ICAM-2 ist dagegen primär konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert (50). Die extrazelluläre Domäne des einkettigen Glykoproteins besteht aus 5 Ig-ähnlichen Domänen, die als Liganden für die  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und MAC-1 auf Granulozyten dienen können. Besatz von ICAM-1 führt zur Aktivierung zahlreicher, u.a. Tyrosin- und MAP Kinasen umfassenden, Signaltransduktionswegen in Endothelzellen (97). Welche Bedeutung und Folgen diese aktivierten Mechanismen für die Orchestrierung der PMN-Endothel Interaktion und die lokale Entzündungsreaktion insgesamt haben, ist kaum untersucht.

VCAM-1 (CD 106) wird von proinflammatorisch aktivierten Endothelzellen (147) und u.a. Epithelzellen (20) exprimiert. Endothelzellen zeigen keine konstitutive Expression von VCAM-1; eine Steigerung der transkriptionell regulierten Expression ist nach ca. 2-4 h nachweisbar, das Maximum wird nach ca. 16-24 h auf der endothelialen Oberfläche detektiert. Neben der Vermittlung des Rollens und Adhärerens von PMN an Endothelzellen binden auch Mono-, Lympho- und verschiedene Tumorzellen an VCAM-1. Dabei dienen die  $\beta_1$ -Integrine  $\alpha_4/\beta_1$  und  $\alpha_4/\beta_7$  auf PMN und VLA4 auf Eosinophilen und Monozyten als Liganden von VCAM-1 (66).

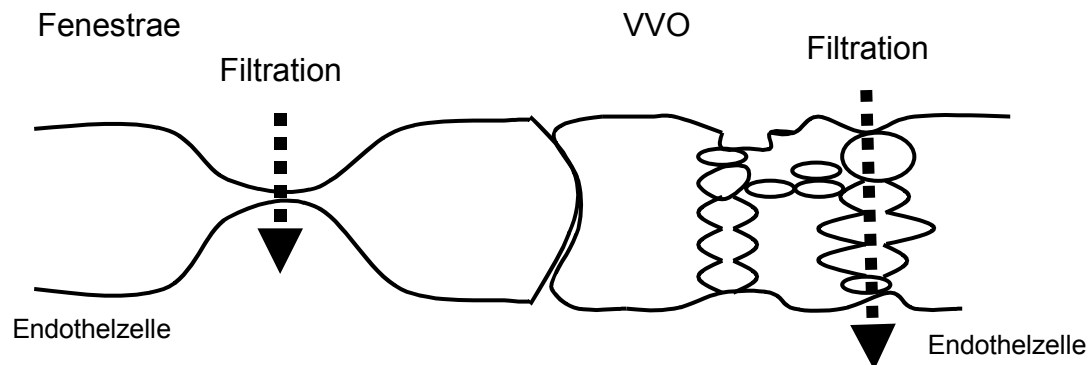
### 2.3.4 Endotheliale Permeabilität

Ob im Blut vorhandene lösliche Bestandteile und korpuskuläre Elemente das Blutgefäß verlassen können, wird durch den Zustand des endothelialen Monolayers und die herrschenden physikalisch-chemischen Bedingungen bestimmt (202;220;221). Mit Ausnahme einiger Gefäßprovinzen (z. B. Leber, Sinusoide des

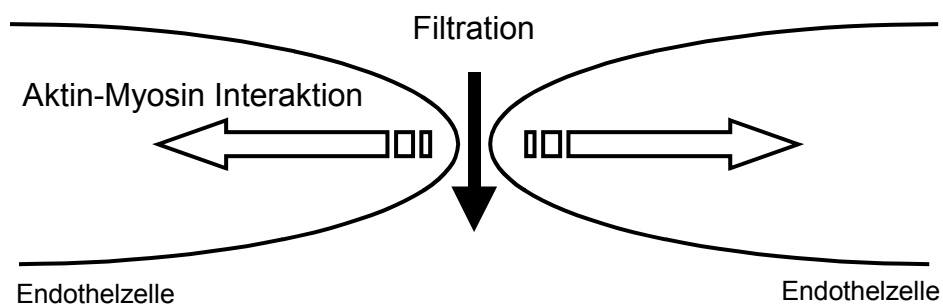
Knochenmarks) bildet unfenestriertes Endothel eine semipermeable Barriere. Endothelzellen müssen bereits bei physiologischen Bedingungen unter Einfluss einer Vielzahl von physikalischen (z. B. Schubspannung, Blutdruck) und chemischen (z. B. Katecholamine) Reizen diese Barrierefunktion aufrechterhalten (11).

Pathologische Verhältnisse lassen das Endothel aufgrund seiner exponierten Lage zum Ziel verschiedenster Stimuli werden, die auf unterschiedlichen Wegen die endotheliale Schrankenfunktion stören. Im Rahmen akuter Entzündungen kommt es regelmäßig zu erhöhter parazellulärer Gefäßpermeabilität (Abb. 12): Pathogene und ihre Produkte (Exotoxine, liberierte Enzyme, Endotoxin), aktiviertes Komplement, Thrombin oder durch aktivierte Granulozyten freigesetzte Substanzen (z. B. Sauerstoffradikale, Proteasen) können zu einem Verlust der endothelialen Barrierefunktion führen (7;11;134;202;221). Die austretenden Blutbestandteile sind in der Lage, die Entzündung zusätzlich zu aggravieren. Darüber hinaus vermögen durch Hypoxie und/oder Reperfusionsschäden induzierte Substanzen (z.B. VEGF) die endotheliale Permeabilität zu steigern. VEGF ist auch für das häufig beobachtete Ödem in der Umgebung maligner Tumore und Tumor-bedingte Angiogenese entscheidend mitverantwortlich (14;62;63) (Abb. 12).

### A. Transzelluläre Permeabilität



### B. Parazelluläre Permeabilität



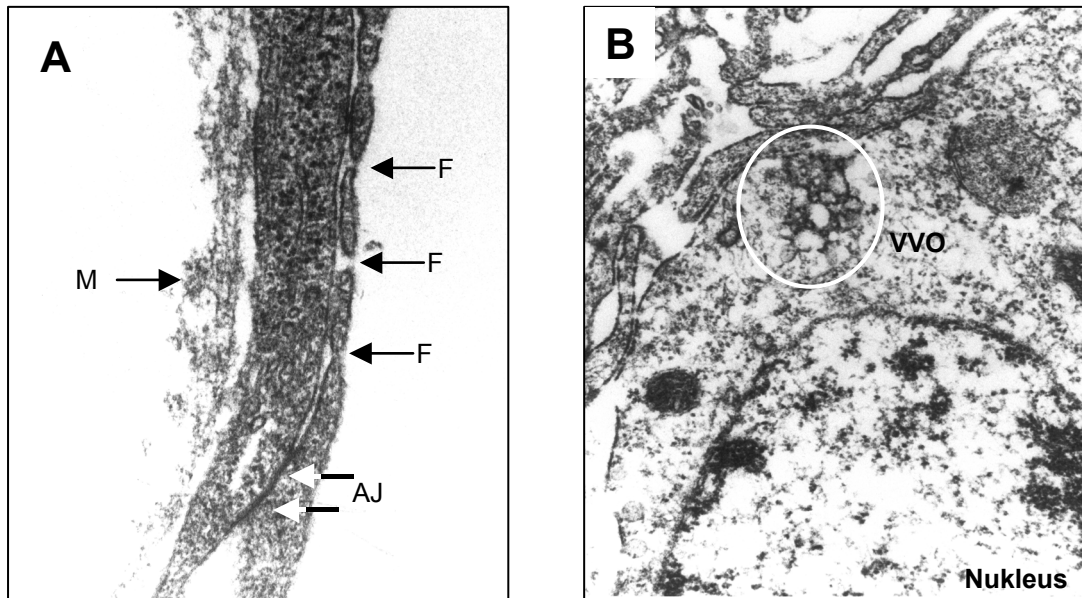
**Abb. 12:** (A) VEGF induziert endotheliale Hyperpermeabilität durch die Induktion von Fenestrae und dem vesikulären-vakuolären Organell (VVO). (B) Kontraktion der Endothelzellen hat die Eröffnung interzellulärer Lücken mit parazellulärer Filtration zur Folge.

#### 2.3.4.1 Transzelluläre Permeabilität

Die Beobachtung, dass das Endothel unter physiologischen Bedingungen eine selektive Barriere für Moleküle unterschiedlicher Größe und Gestalt darstellt, führte zur Entwicklung von sog. Mehr-Poren-Modellen (Transport durch Poren unterschiedlichen Durchmessers). Diese Theorien haben gemeinsam, dass insbesondere die geringe, stets beobachtbare basale Permeabilität über transzelluläre Kanäle/Poren stattfindet und einen geordneten Stoffaustausch ermöglicht. Allerdings ist die Identität und Lokalisation dieser Poren bis heute unklar (174).



Die Entdeckung, dass VEGF die Ausbildung von Fenestrae in normalerweise unfenestriertem Endothel und einem vesikulären-vakuolären Organell (VVO) zu stimulieren vermochte, hat der Diskussion um transzelluläre Permeabilität neue Aktualität verliehen (Abb. 13) (14;62;63;71;72). VEGF ist weit über seine Bedeutung als Permeabilitäts-stimulierendes Agens hinaus ein wichtiger Regulator der Angio- und Vaskulogenese (175;176).



**Abb. 13:** Nachweis von Fenestrae (A) und VVO (B) in VEGF exponierten, auf Polycarbonatfiltermembranen gewachsenen, humanen Endothelzellen. In (A) sind Fenestrae bei gleichzeitig geschlossenen Zell-Zell-Kontakten sichtbar (M, Filtermembran; F, Fenestrae; AJ Adherence junction; VVO, vesikulär-vakuoläres Organell).

Eine Vielzahl von Tumoren sezernieren VEGF mit der Folge von Tumor-induzierter Angiogenese und Tumor-assoziiertem Ödem (26). Insbesondere Hypoxie vermehrt die Expression und Sekretion von VEGF sowie die Expression der VEGF-Rezeptoren (137;175).

VEGF bindet hochspezifisch an die Rezeptoren VEGFR-1 („*fms-like tyrosine kinase*“, Flt-1) und VEGFR-2 („*fetal liver kinase*“, Flk-1; „*kinase insert domain-containing receptor*“, KDR) (175;193). Bei beiden VEGF-Rezeptoren handelt es sich um transmembranöse Glykoproteine mit einer extrazellulären Ligand-bindenden und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase Domäne.

Die Rezeptor-Okkupation führt zu einer komplexen Aktivierung der Endothelzellen, wie sie für andere permeabilitätserhöhende Stimuli bekannt ist: Neben einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , Aktivierung der  $\text{PLC}\gamma$  und  $\text{PKC}\alpha/\beta\text{II}$  sowie der PKB/Akt Kinase wurden auch MAP Kinasen in VEGF-exponierten Endothelzellen aktiviert (73;74;175;193). Trotz der Aktivierung dieser Signalwege, die auch Induktoren parazellulärer Permeabilität zum Ziel haben, hat VEGF-Stimulation von Endothelzellen keine Zellkontraktion und Eröffnung parazellulärer Lücken zur Folge: Topische Injektion von VEGF in Ratten und Mäusen induzierte Fenestrae, d.h. nahe den geschlossenen Zell-Zell-Kontakten gelegene, durch Diaphragmen verschlossene Strukturen (14;62;72). Darüber hinaus erhöht VEGF Permeabilität durch das Vesikulo-Vakuoläre Organell (VVO). Feng et al. (71;72) demonstrierten, dass das Organell etwa 14-18 % des Zytosols der untersuchten Endothelien okkupiert. VVO's repräsentierten traubenartige Gebilde von ca. einhundert, miteinander verbundenen Vesikeln und Vakuolen. Das Organell konnte über multiple Öffnungen mit luminalen und abluminalen Oberflächen in direkten Kontakt treten. Die Koinzidenz von erhöhten VEGF-Spiegeln in abführenden Tumorgefäßen, erhöhter Permeabilität und vermehrter VVO-Aktivität spricht für eine zentrale Bedeutung von VEGF für die Induktion eines peritumoralen Ödems (62;63). Allerdings liegen bis heute kaum Untersuchungen zur Natur dieser endothelialen Struktur vor. In klinischen Studien wird versucht, mit Hilfe von Antagonisten des VEGF-Systems Tumore zu behandeln (26).

Vor dem Hintergrund der besonderen Eigenschaften und der zentralen Bedeutung von VEGF für physiologische (Vaskulogenese) und pathophysiologische (Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität und Angiogenese) Phänomene untersuchten wir in eigenen Studien Mechanismen VEGF-induzierter Hyperpermeabilität (**7 H, 11 H, 15 H**).

#### **2.3.4.2 Parazelluläre Permeabilität**

Parazelluläre Permeabilität wird primär im Rahmen inflammatorischer Prozesse beobachtet. Eine große Anzahl sehr unterschiedlicher Stimuli führen über die Ausbildung interzellulärer Lücken zu erhöhter parazellulärer Permeabilität (7;11;22;202;221): Beispielsweise induzierten bakterielle Poren-bildende Exotoxine (*E. coli* HlyA, *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin), bakterielle Proteasen oder virale Produkte (HIV-Tat

Protein) parazelluläre Hyperpermeabilität. Aktivierte lösliche Bestandteile des Blutes (Komplement, Thrombin) oder Produkte stimulierter Granulozyten (Sauerstoffradikale, Proteasen) können ebenso parazelluläre Lückenbildung hervorrufen. Von elementarer Bedeutung für die Regulation parazellulärer Permeabilität sind das endotheliale Zytoskelett und die junctionalen Zell-Zell Verbindungen.

#### **2.3.4.3 Zytoskelett**

Endothelzellen enthalten ein elaboriertes Mikrofilamentsystem, das grob in ein kortikales Filamentnetz, einen „Junktion-assoziierten“ und einen „Stressfaser“-bildenden Anteil untergliedert werden kann. Für die Regulation der Permeabilität scheint das oft als „peripheral dense band“ bezeichnete „Junktion-assoziierte“ Filamentsystem besonders wichtig zu sein.

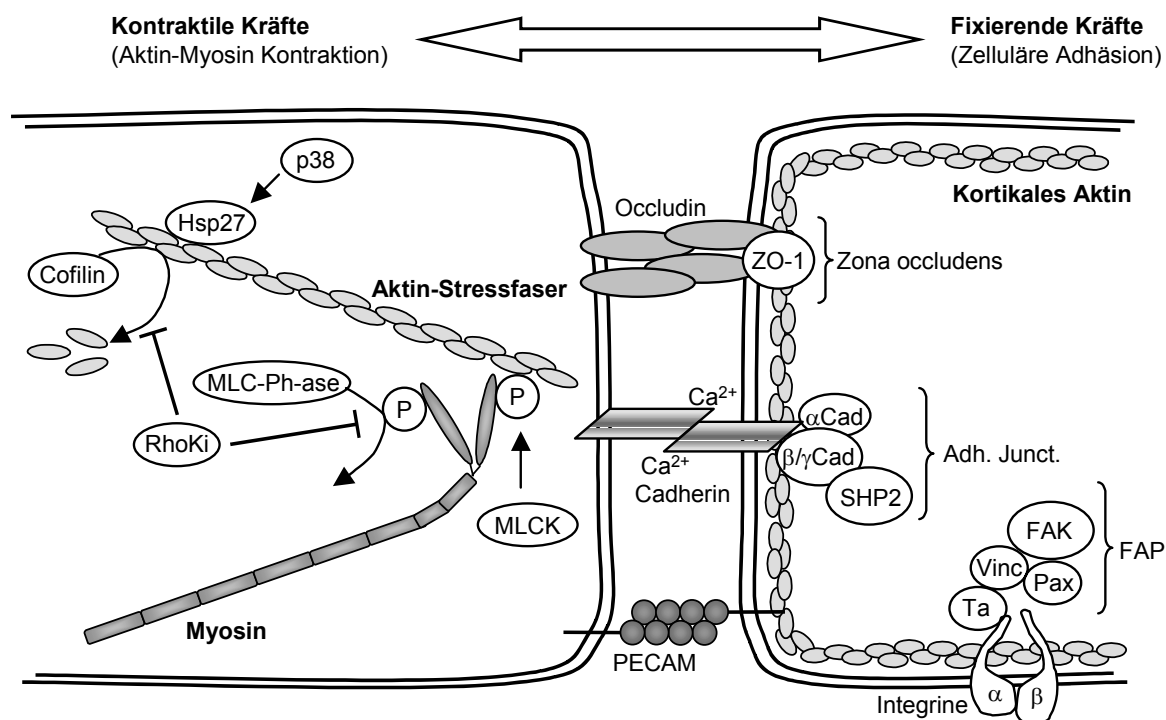
Die generelle Bedeutung des Mikrofilamentsystems für den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion wurde eindrucksvoll durch Untersuchungen mit F-Aktin depolymerisierenden Substanzen belegt: Verkürzung der Aktin-Filamente durch z.B. Botulinum C2-Toxin oder Cytochalasin D führte zum Anstieg der endothelialen Permeabilität *in vitro* (209) und im isolierten Organmodell (67). Umgekehrt stabilisierte eine Blockade der Abdissoziation von G-Aktin am „pointed“ Ende mittels Phalloidin das F-Aktin und damit die endotheliale Barrierefunktion (209).

Wie eine Vielzahl von Studien belegen, kontrahieren Endothelzellen unter pathophysiologischen Bedingungen der Entzündung. Diese aktive Kontraktion trägt substantiell zur interzellulären Lückenbildung mit folgendem parazellulärem Flüssigkeitsfluss bei (Abb. 14) (11;22;202). Das Mikrofilamentsystem bildet mit dem endothelialen Myosin ein kontraktiles Zytoskelett; die Zellen enthalten neben Aktin die Proteine Myosin II, Tropomyosin, „Z-line“-Protein und  $\alpha$ -Actinin, die zum Aufbau von kontraktile Aktin-Myosin-Einheiten benötigt werden.

In mehreren Studien wurde mit unterschiedlichen Verfahren gezeigt, dass z.B. Thrombin-exponierte Endothelzellen kontrahieren und dazu ein intaktes Mikrofilamentsystem benötigen. Die Kontraktion der Zellen war von einer Öffnung interzellulärer Spalten begleitet (11;22;202).

Einen direkten Hinweis für die Notwendigkeit einer dynamischen Aktin-Myosin-Interaktion für die Kontraktion von Endothelzellen ergaben Untersuchungen mit

chemisch modifiziertem Myosin (NEM-S1-Myosin) (187): Wenn kein regulärer Zyklus der Aktin-Myosin-Interaktion mehr möglich war, wurde auch keine Kontraktion und Lückenbildung nachgewiesen.



**Abb. 14:** Die Balance zwischen kontraktilen und fixierenden Kräften trägt wesentlich zur Regulation parazellulärer Permeabilität bei. Neben der Aktivierung Aktin-Myosin abhängiger Zellkontraktion kann auch die Modifikation der Zell-Zell und/oder Zell-Matrix Kontakte zu endothelialer Hyperpermeabilität führen (Hsp27, *heat shock protein 27*; RhoKi, Rho Kinase; MLC-Ph-ase, Myosinleichtketten Phosphatase; Cad, Cadherin; Vinc, Vinculin; Ta, Talin; Pax, Paxillin; FAP, *focal adhesion plaque*).

Für eine erfolgreiche Kraftübertragung - und damit Kontraktion der Endothelzellen - ist die Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC) an Aminosäure Threonin 18 und/oder Serin 19 notwendig (202;220;221). Verschiedene Kinasen, z.B. die MLC-Kinase, Rho-Kinase (*in vitro*) oder PKC können die MLC direkt an diesen kritischen Aminosäuren phosphorylieren. Eine dominante Rolle scheint dabei der Rho-Kinase zuzukommen: Neben einer direkten Phosphorylierung kann die Rho-Kinase durch gleichzeitige Inhibition der MLC-Phosphatase substantiell die Phosphorylierung der MLC erhöhen (150;151;202;220;221). Möglicherweise ist die konzertierte Aktion von MLC- und Rho-Kinase letztlich für die Kontraktion der Endothelzellen verantwortlich.

Obwohl die Rolle der aktiven Kontraktion für parazelluläre Permeabilität unbestritten ist, muss darauf hingewiesen werden, dass die meisten vorliegenden Untersuchungen zu dieser Fragestellung an Thrombin-stimulierten Zellen vorgenommen wurden. Welche Rolle den entsprechenden Kinasen bei anderen Stimuli wie Poren-bildenden bakteriellen Exotoxinen oder Sauerstoffradikalen zukommt, ist weitestgehend unbekannt. Bisherige Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass sehr unterschiedliche Signalwege, ausgelöst durch diverse Stimuli, letztlich durch Aktivierung der MLC-Phosphorylierung eine aktive Kontraktion der Endothelzellen auslösen.

Neben der Aktin-Myosin Interaktion scheinen endotheliale Zell-Zell/Zell-Matrix-Kontakte zur Regulation der endothelialen Barrierefunktion entscheidend beizutragen (11;55;182). Die endothelialen Zellverbindungen (*Zonula occludens*, *Zonula adhaerens*, *Nexus*) sind komplexe, dynamische Strukturen (7;162). Neben mit zur Nachbarzelle gerichteten Elementen sind sie z. T. innerhalb der Zelle über eine Vielzahl von Adaptorproteinen mit dem Zytoskelett verbunden. Die Komposition partizipierender Proteine, ihre Verbindungen untereinander sowie ihre Lokalisation konnten durch wechselnde  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung und die Effektoren kleiner GTP-bindender Rho-Proteine modifiziert werden (55).

Eine direkte Beeinflussung der Zell-Zell/Zell-Matrix Verbindungen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug (Integrin-Matrix Interaktion, VE-Cadherin/Catenin-System) oder Proteasen-Einwirkung (z.B. Elastase) führte zu einem Versagen der endothelialen Barrierefunktion (111;208).

Verschiedene Stimulantien endothelialer Hyperpermeabilität zeigen eine Umverteilung oder den Verlust von Vimentin, Vinculin,  $\alpha$ -Actinin und Spektrin: Dabei wurden diese Proteine (z.B. Vimentin, Vinculin) durch verschiedene Kinasen phosphoryliert (7;55;182;202). Wie bedeutsam diese beschriebenen Veränderungen für die Permeabilitätsregulation letztlich sind, ist nicht im Detail bekannt.

Eigene Untersuchungen hatten zum Ziel, neben Aspekten der basalen Permeabilitätsregulation (**3 H, 18 H**) auch erste therapeutische Ansätze zu erarbeiten (**2 H, 12 H**).

## 2.4 Konsequenzen der Endothelaktivierung

Die Aktivierung des Endothels trägt maßgeblich zur Ausprägung der Symptome Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerz als Merkmale der akuten Entzündung bei. In manchen Situationen haben endotheliale Fehlfunktionen fundamentalen Einfluss auf den Verlauf infektiöser Erkrankungen. Im Rahmen systemischer Infektionen (z.B. der Sepsis) ist das Endothel an der Ausbildung von Multiorganversagen beteiligt (89). Darüber hinaus ist der Verlust der endothelialen Barrierefunktion eine Voraussetzung zur Entwicklung des lebensbedrohlichen Lungenödems beim akuten Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS) (70;89;228).

Die Überwindung der endothelialen Barriere kann einen entscheidenden Schritt bei der Invasion von Pathogenen in besonders geschützte Kompartimente, wie etwa das Gehirn, unter Überwindung der Blut-Hirn Schranke, darstellen (149).

Endotheliale Schädigung und die Aktivierung prothrombotischer Signale durch von EHEC produziertes Shiga Toxin konnten als wichtige Pathomechanismen in der Entwicklung mikroangiopathischer Prozesse des HUS identifiziert werden (107).

Hoch Endothel-affine Bakterien wie *Rickettsiae* lösen schwerste Infektionserkrankungen, wie z.B. „Rocky Mountain spotted“-Fieber durch die primäre Infektion von Endothelzellen aus (219). Multiple, auf das Endothel einwirkende Faktoren der induzierten Immunantwort und die direkte Aktivierung dieser Zellen trägt wesentlich zur Ausbildung oft fatal verlaufender Infektionen wie der Sepsis (89) oder hämorrhagischer Fieber bei (186).

Zunehmende Aufmerksamkeit fokussiert auf der Rolle von chronischer Infektion des Endothels für die Krankheitsentstehung. Mitglieder der *Bartonella*-Spezies werden als kausatives Agens für die Entstehung der Katzenkratzkrankheit und bazillären Angiomatose-Peliose angesehen (52;53). Es wird postuliert, dass die Infektion von Endothelzellen mit Kaposi's Sarkoma assoziiertem Herpesvirus ursächlich an der Entstehung des Kaposi Sarkoms beteiligt ist (164). Weiterhin stark umstritten ist die Hypothese, dass chronischen viralen oder bakteriellen Infektionen eine bedeutende Rolle für die Entstehung und Progression der Arteriosklerose zukommt (153;167).

Ob es sich nun um einfache, lokale oder schwere systemische Entzündungen handelt, besteht bei allgemeiner Betrachtung kein Zweifel daran, dass die Aktivierung

von Endothelzellen wesentlich zur Ausbildung resultierender Erkrankungen beiträgt. Vor diesem Hintergrund kann das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen entscheidende Impulse zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Bekämpfung von Infektion und Inflammation liefern.

### 3 Eigene Arbeiten – Zielsetzung

Die Aktivierung von Endothelzellen durch Pathogene und deren Produkte sowie die folgende Wirtsantwort umfasst mehrere, miteinander verflochtene Aspekte der Infektionsbiologie. Um einer möglichen rationalen antiinflammatorischen Therapie des Endothels näherzukommen, ist das Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen notwendig. Die beschriebenen Untersuchungen fokussierten auf drei Schwerpunkten:

#### 4.1 Funktion von kleinen GTP bindenden **Rho-Proteinen**.

4.1.1 Es wurde die Hypothese geprüft, dass Rho-Proteine eine Funktion als **Schaltmoleküle in der proinflammatorischen Signaltransduktion** von Endothelzellen wahrnehmen.

4.1.2 Weiterführende Experimente demonstrierten eine zentrale Rolle der Rho-Proteine in der Regulation des **programmierten Zelltods (Apoptose)** von Endothelzellen.

#### 4.2 Regulation der **endothelialen Barrierefunktion**.

4.2.1 Die Bedeutung des **Zytoskeletts** für den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion wurde analysiert.

4.2.2 Folgende Studien prüften **therapeutische Ansätze** zur Behandlung einer parazellulären endothelialen Schrankenstörung.

4.2.3 Des weiteren erfolgte die Untersuchung von Mechanismen **VEGF-induzierter tranzellulärer Permeabilität**.

#### 4.3 **Rekrutierung von Endzündungszellen** durch Endothelzellen.

4.3.1 Es wurde geprüft, ob die Stimulation von Endothelzellen durch **bakterielle Exotoxine** eine vermehrte Granulozyten-Endothel-Interaktion zur Folge hat.

4.3.2 Experimente mit verschiedenen **bakteriellen Modellkeimen** erbrachten Einblick in die Mechanismen, über welche die bakterielle Aktivierung von Endothelzellen zur Granulozytenrekrutierung führt und identifizierten bakterielle Pathogenitätsfaktoren.



Insgesamt dienten die Arbeiten dem Zweck, Pathomechanismen der Endothelaktivierung besser zu verstehen.

Wesentliche Aspekte der Interaktion von Pathogenen mit Endothelzellen wurden in einer **Übersichtsarbeit zusammengefasst (4.4)**.

## **4 Darstellung der eigenen Arbeiten**

### **4.1 Rho-Proteine und Endothelzellfunktion**

Kleine GTP-bindende Rho-Proteine wirken als zentrale regulatorische Schaltmoleküle an der Organisation des Zytoskeletts und der Steuerung verschiedener wichtiger Signaltransduktionswege wesentlich mit. Wir prüften die Hypothese, dass Rho-Proteine Bestandteil der proinflammatorischen Signalwege von Endothelzellen sind.

#### 4.1.1 Funktion von Rho-Proteinen in der inflammatorischen Signaltransduktion von Endothelzellen

Hippenstiel, S., T. Kratz, M. Krüll, J. Seybold, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Inhibition of Rho proteins blocks protein kinase C translocation and activation.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 830-834, 1998.

**6 H**

Hippenstiel, S., S. Soeth, B. Kellas, O. Fuhrmann, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, M. Goebeler, S. Ludwig, and N. Suttorp. Rho protein and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells.

*Blood* 95:3044-3051, 2000.

**9 H**

Hippenstiel, S., B. Schmeck, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) related nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) translocation but not inhibitor kappa-B ( $\text{I}\kappa\text{B}$ )-degradation by Rho protein inhibition in human endothelial cells.

*Biochem. Pharmacol.* 64:971-977, 2002.

**13 H**

Schmeck, B., M. Brunch, J. Seybold, M. Krüll, C. v. Eichel-Streiber, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. Rho protein-inhibition blocks Prostaglandin H synthase-2-expression by proinflammatory mediators in endothelial cells.

Akzeptiert bei *Inflammation*.

**17 H**

Zur Entwicklung neuer, rationaler, antiinflammatorischer Therapien des Endothels ist das Verständnis zugrundeliegender Signalwege eine Voraussetzung. Die Bedeutung von kleinen GTP-bindenden Rho-Proteinen für die Regulation des Zytoskeletts war bekannt und u.a. eigene Untersuchungen demonstrierten eine wesentliche Rolle der Rho-Proteine für die Regulation der endothelialen Barrierefunktion. Weiterführende eigene Arbeiten prüften die Hypothese, dass Rho-Proteine eine Funktion als Schaltmoleküle in der proinflammatorischen Signaltransduktion wahrnehmen.

Lipopolysaccharid (LPS) führt über die Aktivierung komplexer Signalwege zu einem proinflammatorischen Phänotyp von Endothelzellen. Unsere Untersuchungen zeigten eine zentrale Rolle von Rho-Proteinen für diese Signaltransduktion: selektive Blockade der Rho-Proteine durch spezifische clostridiale Zytotoxine inhibierte die Aktivierung der Protein C-Kinasen (PKC) durch LPS. Dabei wirkte RhoA als ein Adaptormolekül für die PKC $\alpha$  an der inneren Zellmembran. Inhibition der Rho-Proteine führte zur Blockade LPS-induzierter Tyrosinphosphorylierung, NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Interleukin-8 (IL-8)- sowie Cyclooxygenase 2-Expression, hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktivierung der p38 MAP Kinase. Untersuchungen mit MKK6-transfiziertem Endothel zeigten einen Rho-unabhängigen, parallelen LPS-aktivierten Signalweg der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und IL-8-Expression in humanen Endothelzellen.

Darüber hinaus konnten Rho Proteine als Schaltmoleküle im TNF $\alpha$ -Signalweg humaner Endothelzellen identifiziert werden: Blockade von Rho inhibierte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und folgende, NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression. Interessanterweise wurde dabei die Translokation von NF- $\kappa$ B inhibiert, obwohl die klassischen, zytosolischen Inhibitoren von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs) degradiert waren. Zur Zeit versuchen wir, den dieser Beobachtung zugrundeliegenden Mechanismus zu erarbeiten.

Insgesamt konnten Rho-Proteine als wesentliche Schaltmoleküle in bedeutenden proinflammatorischen Signalwegen von Endothelzellen identifiziert werden. Derzeitige, weiterführende Untersuchungen sollen die Stellung der Rho-Proteine in diesen Signalwege aufzeigen.

#### 4.1.2 Rho-Proteine und endotheliale Apoptose

Hippenstiel, S., B. Schmeck, P. Dje N'Guessan, J. Seybold, M. Krüll, K. Preissner, C. v. Eichel-Streiber, and N. Suttorp. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells.

*Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283:L830-838, 2002.

**14 H**

Apoptose oder programmierter Zelltod beschreibt ein Phänomen, bei dem die Aktivierung präformierter biochemischer Signalwege zu einem suizidalen Zelltod führt. Die kontinuierliche, u.a. von dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B abhängige Expression anti-apoptotischer Moleküle in Endothelzellen wirkt dabei dem Zelltod entgegen. Da u.a. eigene Voruntersuchungen eine wesentliche Funktion von Rho-Proteinen in diesen Signalpfaden demonstrierten, testeten wir die Hypothese, dass langfristige Blockade der Rho-Proteine zu endothelialer Apoptose führt.

Inhibition von RhoA, nicht jedoch von Rac1 und Cdc42, induzierte zeit- und dosisabhängig endotheliale Apoptose. Ebenso hatte die Blockade der für die Membranlokalisation (und Aktivierung) der Rho-Proteine notwendigen Protein-Prenylierung programmierten Zelltod zur Folge. Die mit der Inhibition der Rho-Proteine einhergehenden Veränderungen des Mikrofilamentsystems alleine waren nicht ausreichend, um Apoptose auszulösen.

Rho-Blockade aktivierte die Initiator-Caspase 9 und die Effektor-Caspase 3, hatte jedoch keinen Effekt auf die Aktivität der Initiator-Caspase 8. Die Aktivierung der Caspase 9 wird primär nach Perturbation der Mitochondrien beobachtet. Die Regulation mitochondrialer Apoptosefaktoren unterliegt u.a. der Kontrolle Bcl-2-artiger Proteine, die sowohl anti- (z.B. Bcl-2, Mcl-1) als auch pro-apoptotische (Bax, Bid) Effekte haben können. Inhibition der Rho-Proteine reduzierte die Expression der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1, so dass sich das Gewicht hin zu pro-apoptotischen Proteinen verschob.

Da die Erhöhung von cAMP vielfältige anti-entzündliche und stabilisierende Effekte auf Endothelzellen hat, prüften wir, ob die Erhöhung von cAMP Endothelzellen ohne funktionstüchtige Rho-Proteine vor Apoptose schützt. Sowohl die Aktivierung der Caspase 3 als auch endotheliale Apoptose wurde durch cAMP blockiert.

Zusammengefasst sind funktionstüchtige Rho-Proteine für das langfristige Überleben von Endothelzellen *in vitro* notwendig. Weiterführende Untersuchungen zu den

zugrundeliegenden Mechanismen und der Übertragbarkeit der Befunde *in vivo* stehen derzeit aus.

## **4.2 Regulation endothelialer Permeabilität**

Unfenestriertes Endothel bildet eine semipermeable Grenzschrift zwischen Intra- und Extravasalraum. Im Rahmen von Entzündungen kommt es regelhaft zu erhöhter parazellulärer endothelialer Permeabilität durch die Eröffnung interzellulärer Spalten. Im Gegensatz dazu kann die Ausschüttung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) zu endothelialer Hyperpermeabilität bei geschlossenen Zell-Zell-Verbindungen führen. Das Verständnis zugrundeliegender Mechanismen kann zur Entwicklung rationeller Therapiestrategien zur Beeinflussung der endothelialen Barrierefunktion beitragen.

#### 4.2.1 Parazelluläre Permeabilität

Hippenstiel, S., S. Tannert-Otto, N. Vollrath, M. Krüll, I. Just, K. Aktories, C. von Eichel-Streiber, and N. Suttrop. Glucosylation of small GTP-binding proteins disrupts endothelial barrier function.

*Am. J. Physiol.* 272: L38-43, 1997.

**3 H**

Hippenstiel, S., H.-W. Mühle, M. Krüll, J. Seybold, and N. Suttrop. Depolymerization of microtubuli induced endothelial barrier dysfunction.

Eingereicht zur Publikation.

**18 H**

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war bekannt, dass direkte Perturbation des endothelialen Mikrofilamentsystems zu endothelialer Hyperpermeabilität führt. Mehrere Studien zeigten eine Bedeutung von kleinen GTP-bindenden Rho-Proteinen für die Regulation des Mikrofilamentsystems. Die Entdeckung, dass große clostridiale Zytotoxine endozytotisch in Endothelzellen aufgenommen werden und Rho-Proteine durch kovalente Modifikation selektiv inaktivieren, ermöglicht den Gebrauch dieser bakteriellen Enzyme als präzise zellbiologische Werkzeuge. *Clostridium difficile* Toxin B vom Stamm 10463 (TcdB-10463) inaktiviert RhoA, Rac1 und Cdc42 durch Glukosylierung an Aminosäure Threonin 35/37. Wir nutzten TcdB-10463, um die Rolle der Rho-Proteine für die Regulation der endothelialen Barrierefunktion zu untersuchen.

Nachdem wir den Nachweis der Glucosylierung von Rho-Proteinen durch TcdB-10463 in Endothelzellen erbracht hatten, inaktivierten wir RhoA, Rac1 und Cdc42 durch TcdB-10463: Das Toxin führte zeit- und dosisabhängig zum Verlust der endothelialen Barrierefunktion. Diesem Permeabilitätsanstieg ging eine Fragmentierung des endothelialen F-Aktins voraus. In der Immunfluoreszenz war diese ebenso nachweisbar wie die massive Retraktion der Endothelzellen. Vorbehandlung des Endothels mit Phalloidin stabilisierte das F-Aktin und die endotheliale Barrierefunktion. Diese Experimente zeigten einen ersten Zusammenhang zwischen Rho-Proteinen und dem Verhalten von Endothelzellen unter inflammatorischen Bedingungen.



Im Gegensatz zur sehr gut untersuchten Rolle der Mikrofilamente für die Regulation der endothelialen Barrierefunktion ist wenig über die Funktion des Mikrotubulussystems in diesem Zusammenhang bekannt.

Depolymerisation der Mikrotubuli durch verschiedene Agenzien erhöhte endotheliale Permeabilität; Stabilisierung der Mikrotubuli hob diesen Effekt auf. Interessanterweise führte die Perturbation der Mikrotubuli zur Polymerisation des F-Aktins, der Ausbildung von Stressfasern und Zellkontraktion. Umgekehrt hatte die Depolymerisation des F-Aktins keinen Effekt auf die Organisation der Mikrotubuli.

Derzeit untersuchen wir, ob und welche Bedeutung den Mikrotubuli für die endotheliale Schrankenstörung unter inflammatorischen Bedingungen zukommt.

#### 4.2.2 Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion

Suttorp, N., P. Ehreiser, S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, H. Tenor, and C. Schudt. Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4.

*Lung* 174: 181-194, 1996.

**2 H**

Hippenstiel, S., M. Witzernath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krüll, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schütte, and N. Suttorp. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability.

*Circ. Res.* 91:618-625, 2002.

**12 H**

Der durch parazelluläre Spaltenbildung verursachte Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion mit folgender Ödembildung kann Entzündungsreaktionen aggravieren und, z.B. in der Lunge, zu lebensbedrohlichem Organversagen führen. Bei der Suche nach einer potentiellen Therapie der endothelialen Schrankenstörung erwies sich die Erhöhung der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP als sehr effektiv. Die Aktivierung der Adenylyl- oder Guanylylzyklase blockierte durch verschiedene Agenzien ausgelöste para- und transzelluläre Hyperpermeabilität *in vitro* und *in vivo*.

Phosphodiesterasen (PDE) entwerten zyklischen Nukleotide durch Hydrolyse. Wir stellten fest, dass humane Endothelzellen Aktivität der PDE2-4 enthalten. Selektive Inhibition einzelner PDEs bei gleichzeitiger Aktivierung der zyklischen Nukleotidbildung erhöhte die therapeutische Potenz dieses Vorgehens beträchtlich.

Die potentielle klinische Bedeutung der Erhöhung zyklischer Nukleotide demonstrierten Studien mit dem körpereigenen Peptid Adrenomedullin: Adrenomedullin blockierte durch verschieden Stimuli ausgelöste Hyperpermeabilität in kultivierten Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßprovinzen. Darüber hinaus schützte es im Modell der isolierten, ventilierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge vor Ödembildung. Die Adrenomedullin-induzierte Bildung von cAMP führte zur Blockade der Phosphorylierung der Myosinleichtkette in Endothelzellen. Dadurch unterblieb die Aktin-Myosin basierte Zellkontraktion und interzelluläre Lückenbildung. Ob die bei Patienten mit systemischer Inflammation oder ARDS massiv erhöhten Serumspiegel von Adrenomedullin Ausdruck einer

antiinflammatorischen Gegenregulation sind, bleibt zu klären. In aktuellen Untersuchungen prüfen wir den therapeutischen Einsatz von Adrenomedullin *in vitro* sowie in einem ARDS Ganztiermodell.

Insgesamt könnte die gezielte Erhöhung zyklischer Nukleotide einen rationalen und erfolgversprechenden Ansatz zur Therapie einer endothelialen Schrankenstörung bieten.

### 4.2.3 Transzelluläre Permeabilität

Hippenstiel, S., M. Krüll, A. Ikemann, W. Risau, M. Clauss, and N. Suttrop.  
VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells.

*Am. J. Physiol.* 274: L678-L684, 1998.

**7 H**

Clauss, M., C. Sunderkötter, B. Sveinbjörnsson, S. Hippenstiel, A. Willuweit, M. Marino, E. Haas, R. Seljelid, P. Scheurich, N. Suttrop, M. Grell, and W. Risau. A permissive role for TNF- $\alpha$  in VEGF-induced vascular permeability.

*Blood* 97:1321-1329, 2001.

**11 H**

Issbrücker K., H.H. Marti, S. Hippenstiel, G. Springmann, R. Vosswinkel, A. Gaumann, G. Breier, H. Drexler, N. Suttrop, and M. Clauss. p38 MAPK – A molecular switch between angiogenesis and vascular permeability.

*FASEB J.* 17:262-264, 2003

**15 H**

Neben der bei inflammatorischen Prozessen beobachteten parazellulären Permeabilität gibt es in besonderen Situationen transzelluläre Hyperpermeabilität des Endothels. Hierbei kommt es bei (elektronenmikroskopisch) intakten Zell-Zell Kontakten und fest geschlossenen Junctionen zwischen den Endothelzellen zur vermehrten Filtration von Wasser und Makromolekülen. Diese Form der endothelialen Barrierestörung findet sich u.a. unter hypoxischen Bedingungen und im Bereich von Tumoren. Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) ist wesentlich an der Ausbildung dieser Funktionsänderung des Endothels beteiligt. Unsere Untersuchungen demonstrierten eine direkte Permeabilitäts-steigernde Wirkung von VEGF. Obwohl sich nachweisen liess, dass VEGF Endothelzellen innerhalb von Minuten aktiviert, vergingen mehr als zwei Stunden bis zum Anstieg der Permeabilität. Derzeit kann nur spekuliert werden, ob in dieser Zeit entscheidende Modifikationen des Vesikulär-Vakuolären Organells stattfinden, die zu VEGF induzierter transzellulärer Permeabilität beitragen.

Weiterführende Untersuchungen *in vitro* und unter Einsatz von „knock-out“ Mäusen adressierten die VEGF Signaltransduktion in Endothelzellen: Es zeigte sich, dass die Expression von transmembranösem TNF (tmTNF) eine Voraussetzung für VEGF

induzierte Permeabilität, nicht jedoch für VEGF abhängige Proliferation ist. Die Signalwege von tmTNF und VEGF konvergieren offenbar in der Aktivierung der p38 MAP Kinase: (a) tmTNF aktivierte p38 MAP Kinase *in vitro*. (b) Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* blockierte die Inhibition p38 MAP Kinase VEGF-assoziierte Permeabilität.

Dieser Beobachtung folgend zeigte sich, dass die p38 MAP Kinase als eine Art molekularer Schalter zwischen Permeabilität und Angiogenese wirken könnte: Blockade der p38 MAP Kinase erhöhte VEGF-induzierte Angiogenese *in vitro* und *in vivo*, begleitet von verlängerter ERK1/2 Aktivität, verringerter endothelialer Apoptose und vermehrter Plasminogen Aktivität. Gleichzeitig reduzierten p38 MAP Kinase-Inhibitoren VEGF-induzierte Permeabilität *in vitro* und *in vivo*.

### **4.3 Regulation der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle**

Die Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Endzündungszellen durch Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle für den Verlauf von Infektionen. Unser Ziel war es, zugrundeliegende Mechanismen anhand von bakteriellen Modelltoxinen oder Modellkeimen zu identifizieren.

#### 4.3.1 Porenbildende Exotoxine

Krüll, M., C. Dold, S. Hippenstiel, S. Rosseau, J. Lohmeyer, and N. Suttrop. *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin potently induce neutrophil adhesion to human endothelial cells. *J. Immunol.* 157: 4133-4140, 1996.

**1 H**

Porenbildende Exotoxine inserieren in Zellmembranen und polymerisieren dort unter der Ausbildung definierter transmembranöser Poren.

*E. coli* Hämolysin (HlyA) und *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin sind wesentliche Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* bzw. *S. aureus*. Die Rekrutierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) durch die geordnete Expression und Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten ist ein essentieller Schritt im Rahmen entzündlicher Reaktionen. Wir prüften die Hypothese, dass bakterielle Exotoxine durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen die PMN-Endothel-Interaktion stimulieren.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass HlyA und *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin die Expression von P-Selektin und Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) auf Endothelzellen stimulierten, jedoch keinen Einfluss auf die Expression von E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 hatten. Während HlyA die Oberflächen-Exposition der Adhäsionsmoleküle CD11b/CD18 auf PMN stimulierte, zeigte  $\alpha$ -Toxin keinen Effekt. Die Expression der Adhäsionsmoleküle führte zu verstärkter Adhäsion der PMN an Endothelzellen. Die Exotoxin-assoziierte vermehrte Interaktion von Granulozyten und Endothelzellen kann wesentlich zur Aggravierung entzündlicher Reaktionen beitragen.

### 4.3.2 Intrazelluläre Bakterien

Krüll, M., R. Nöst, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells.

*J. Immunol.* 159: 1970-1976, 1997.

**4 H**

Schwarzer, N., R. Nöst, J. Seybold, S. K. Parida, O. Fuhrmann, M. Krüll, R. Schmidt, R. Newton, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp. Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor- $\kappa$ B activation and E-selectin expression in human endothelial cells.

*J. Immunol.* 161: 3010-3018, 1998.

**5 H**

Krüll, M., A. C. Klucken, F. N. Wuppermann, O. Fuhrmann, C. Magerl, J. Seybold, S. Hippenstiel, J. H. Hegemann, C. A. Jantos, and N. Suttorp. Endothelial cell activation following infection with *Chlamydia pneumoniae*.

*J. Immunol.* 162: 4834-4841, 1999.

**8 H**

Fuhrmann, O., M. Arvand, M. Krüll, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio and N. Suttorp. *Bartonella henselae* outer membrane proteins (omp) induces NF- $\kappa$ B-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors.

*Inf. Immun.* 69: 5088-5097, 2001.

**10 H**

Krüll, M., A. C. Klucken, C. Magerl, J. Seybold, S. Ludwig, M. Maas, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. *Chlamydia pneumoniae* mediated activation of mitogen-activated protein kinase cascades in human endothelial cells.

Eingereicht zur Publikation.

**19 H**

Neben sekretorischen Produkten von Bakterien, wie Poren-bildenden Exotoxinen, kommt das Endothel direkt mit eine Vielzahl von Mikroben in Kontakt. Wir begannen



anhand von (teils fakultativ) intrazellulär in Endothelzellen parasitierenden Bakterien, die Pathogen-Wirtszell Interaktion zu studieren. Unser Ziel war es, erste Pathogenitätsfaktoren der Bakterien und ihre Effekte auf Endothelzellen zu identifizieren. Dabei fokussierten wir auf den bakteriellen Einfluß auf die Leukozyten-Endothel Interaktion.

Alle drei untersuchten Bakterien (*Listeria monocytogenes*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia pneumoniae*) replizierten in Endothelzellen und führten zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und der Rekrutierung von Leukozyten.

Durch Einsatz von *L. monocytogenes*-Deletionsmutanten konnten die bakterielle PI-PLC und PC-PLC als bedeutende listerielle Virulenzfaktoren identifiziert werden: Die bakteriellen PLC führten zu gesteigerter Zeramidsynthese, subsequenter NF- $\kappa$ B-Aktivierung und folgender E-Selektin-Expression während die beobachtete P-Selektin-Expression Listeriolysin-abhängig war.

*C. pneumonia* induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen und IL-8 war von der Chlamydien-induzierten MAPK- und folgenden NF- $\kappa$ B-Aktivierung abhängig.

Durch *B. henselae* aktivierte Endothelzellen zeigten eine starke NF- $\kappa$ B-abhängige Adhäsionsmolekülexpression. Isolierte *B. henselae* "outer membrane proteins" (OMP) waren in der Lage, Endothelzellen ähnlich wie komplette Bakterien zu stimulieren.

Insgesamt konnten einige Pathogenitätsfaktoren dieser Bakterien in der Interaktion mit Endothelzellen beschrieben werden. Obwohl verschiedene bakterielle Produkte an der Auslösung entsprechender Signalkaskaden beteiligt sind, gibt es offensichtlich stereotype Antworten des Endothels (z.B. NF- $\kappa$ B-Aktivierung, Adhäsionsmolekül-Expression) auf Exposition gegenüber intrazellulären Bakterien. Dabei rekrutieren bakterielle Produkte präformierte Signalwege der Wirtszellen. Gegenwärtige Untersuchungen haben zum Ziel, Pathogen-spezifische Wirtszellsignalwege zu identifizieren, um Grundlagen für eine rationale, keimspezifische nicht-antibiotische Therapie zu legen.

#### 4.4 Übersicht über die Interaktion von Pathogenen mit dem Endothel

Hippenstiel, S, and N. Suttorp. Interaction of pathogens with the endothelium.

*Thromb. Haemost.* 89: 18-24, 2003.

**17 H**

Bedingt durch die Lokalisation an der Grenzfläche zwischen Blut und Gewebe kommt das Endothel mit unterschiedlichsten Pathogenen und ihren Produkten in Kontakt. Gleichzeitig wirken Faktoren der Immunantwort auf das Endothel ein. Dieser Übersichtsartikel fasst grundlegende Mechanismen dieser komplexen Interaktion zusammen und weist auf offene Fragestellungen hin.

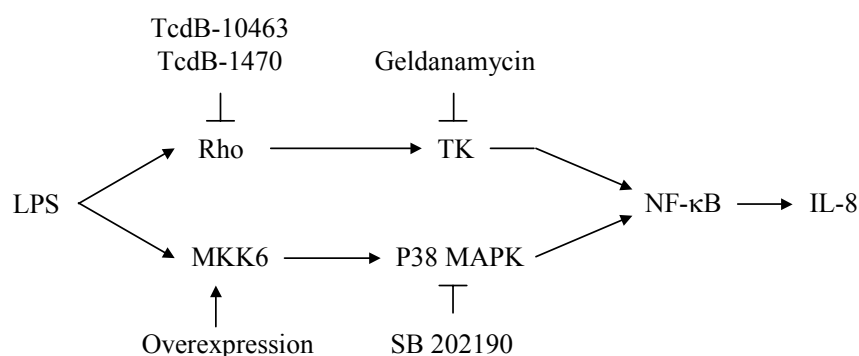
## 5 Diskussion

### 5.1 Funktion von Rho-Proteinen in Endothelzellen

Initiale Untersuchungen identifizierten Rho-Proteine als zentrale Regulatoren des Mikrofilamentsystems (213) (**3 H**). Weiterführende Analysen ergaben, dass diese Moleküle auch als wichtige Schaltmoleküle in verschiedenen Signaltransduktionswegen in eukaryonten Zellen wirken (114;172;213). Eigene Untersuchungen prüften die Rolle der Rho-Proteine in der proinflammatorischen Transformation von Endothelzellen.

Die Exposition von Endothelzellen gegenüber Bakterien und ihren Bestandteilen (z.B. LPS) sowie Produkten der körpereigenen Immunantwort (z.B. Zytokine wie TNF), hat die Aktivierung der Endothelzellen zur Folge. Verschiedenste Signalwege, die meist die Stimulation NF- $\kappa$ B abhängiger Gentranskription beinhalten, tragen zur Ausprägung der Zellantwort bei.

Die Blockade der Rho Proteine RhoA, Cdc42 und Rac1 durch *C. difficile* Toxin TcdB-10643 reduzierte die LPS-induzierte Tyrosinphosphorylierung, NF- $\kappa$ B Aktivität sowie folgende IL-8- (**9 H**) und COX-2-Expression (**17 H**) im Endothel, hatte jedoch keinen Effekt auf LPS-induzierte p38 MAP Kinasen Aktivität. Stimulation der p38 MAP Kinase alleine war ausreichend, um die IL-8-Bildung zu induzieren. Somit induziert LPS in Endothelzellen sowohl einen Rho abhängigen als auch einen Rho unabhängigen Signalweg, die beide zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B beitragen (Abb. 15)



**Abb. 15:** LPS stimuliert Rho abhängige und Rho unabhängige Signalwege in Endothelzellen.

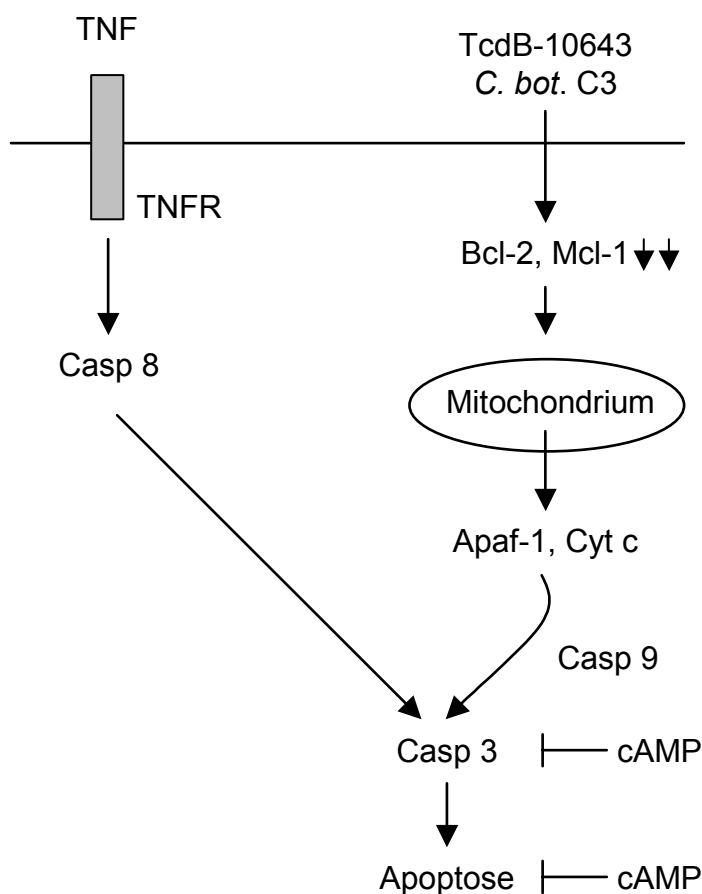
Darüber hinaus zeigten Essler et al. (69), dass Blockade von Rho die LPS induzierte, Rho-Kinase abhängige Reorganisation des Zytoskeletts in Endothelzellen verhindert. Vor dem Hintergrund, dass LPS Endothelzellen über die Rekrutierung von TLR4 aktiviert, scheinen nach unseren Beobachtungen Rho-Proteine in die proximale Signaltransduktion dieses bedeutenden Rezeptors involviert zu sein. Der TLR4-Signalpfad weist starke Übereinstimmungen mit dem des IL-1-Rezeptors auf (4;243). Die Beobachtung, dass Rho direkt mit dem IL-1-Rezeptor assoziiert, kann als weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle von Rho als Element des TLR-Signalweges interpretiert werden (195). Außerdem konnte die GTPase Rac1 als ein Teil des TLR2 Signalweges in Zelllinien identifiziert werden (9).

Neben den beschriebenen Signalwegen aktiviert LPS die PKC in Endothelzellen. Unsere Untersuchungen ergaben, dass Rho-, nicht jedoch Ras-Inhibition, die Aktivierung der PKC blockiert (**6 H**). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Rho als ein Ankerprotein der translozierenden PKC $\alpha$  an der Zellmembran fungiert. Diese Hypothese verifizierten mehrere Studien anderer Arbeitsgruppen (42;185;198).

TNF $\alpha$  ist ein potentes Zytokin und aktiviert zahlreiche proinflammatorische und anti-apoptotische Signalwege in Endothelzellen. Die elektive Blockade einzelner Rho-GTPasen in Endothelzellen demonstrierte die Abhängigkeit TNF $\alpha$ -induzierter NF- $\kappa$ B Genexpression, DNA-Bindung und der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern von RhoA (**13 H**). Interessanterweise unterblieb die NF- $\kappa$ B Translokation, obwohl die zytosolischen Inhibitoren von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, degradiert waren. Diese Blockade der Translokation war unabhängig von der Unversehrtheit des Mikrofilamentsystems und der Rho-Kinase Aktivität. Über den zugrundeliegenden Mechanismus kann derzeit nur spekuliert werden. Eine prüfbare Hypothese ist, dass für die Translokation von NF- $\kappa$ B eine Rho abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors nach TNF $\alpha$ -Stimulation erfolgen muss. Ein solcher Mechanismus wurde für das NF- $\kappa$ B homologe Protein Dorsal in *Drosophila melanogaster* beschrieben (60).

Endothelzellen sind gegenüber einer Vielzahl proapoptotischer Stimuli resistenter als andere Zellen, wie z.B. Leukozyten. Dazu trägt die Expression antiapoptotischer Moleküle, die durch NF- $\kappa$ B positiv reguliert wird, wesentlich bei (51;241). In diesen Zellen hat TNF $\alpha$ -Stimulation einerseits die Aktivierung Caspase 8-abhängiger Apoptose zur Folge. Andererseits wird gleichzeitig die Expression antiapoptotischer Moleküle (z.B. „inhibitors of apoptosis“, IAP) induziert, die wiederum Caspase 8

hemmen können (16;51;230;241). Blockiert man die (NF- $\kappa$ B-abhängige) Transkription dieser antiapoptotischen Moleküle, nimmt die Empfindlichkeit der Endothelzellen gegenüber Apoptose signifikant zu. Vor diesem Hintergrund analysierten wir Apoptose in Endothelzellen mit blockierten Rho-Proteinen (**14 H**). Die Inhibition der Rho-Proteine induzierte massive Apoptose von Endothelzellen, wobei insbesondere intaktes RhoA für das Überleben der Zellen notwendig war. Diese Apoptose wurde durch Aktivierung der Caspasen 9 und 3 exekutiert, die Caspase 8 spielte keine Rolle (Abb. 16). Aktivierung der Caspase 9 erfolgt klassischerweise durch eine Freisetzung mitochondrialer Faktoren (56;64). Diese kann u.a. durch pro- und antiapoptotische Moleküle der Bcl-2 Familie reguliert werden (56). Da TcdB-10643 die Expression der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine Bcl-2 und Mcl-1 reduzierte (**14 H**), darf angenommen werden, dass der Destabilisierung der mitochondrialen Funktion eine wesentliche Rolle für die beobachtete Apoptose zukommt (56).



**Abb. 16:** Synopsis von Rho-Inhibition und endothelialer Apoptose. Blockade der Rho-Proteine durch bakterielle Toxine (TcdB-10643, Bot. C3 Toxin) führt zur reduzierten Expression anti-apoptotischer Moleküle, Aktivierung der Caspase (Casp) 9 und Apoptose. Erhöhung von cAMP blockiert auf unbekanntem Weg die Caspasen-Aktivierung und Apoptose.

Nach diesen und anderen Untersuchungen wirken Rho-Proteine als zentrale Schaltmoleküle in der proinflammatorische Aktivierung von Endothelzellen mit. Aktuelle Untersuchungen legen nahe, dass klinisch eingesetzte Hemmstoffe der HMG-Co Enzym A Reduktase einen wichtigen Teil ihrer vaskuloprotektiven Wirkung über die Hemmung der Rho-Proteine entfalten (10;121;122). Das Produkt Mevalonsäure der HMG-Co Enzym A Reduktase ist Ausgangssubstrat für posttranslationelle Prenylierung der Rho-GTPasen, die für deren Aktivierbarkeit und Membranlokalisation notwendig ist (121;213). Darüber hinaus hemmte das Statin Simvastatin *S. aureus*-induzierte Inflammation *in vitro* und *in vivo* (170). Zusammengefasst stützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass Rho-Protein-abhängige Prozesse zentrale Funktionen im Gefäßsystem, und insbesondere in Endothelzellen, spielen.

## 5.2 Parazelluläre endotheliale Permeabilität

Durch Retraktion der Endothelzellen unter dem Einfluß inflammatorischer Agenzien kommt es regelmäßig zur interzellulären Lückenbildung mit der Folge des Verlusts der endothelialen Barrierefunktion gegenüber Wasser und Makromolekülen. Eine Vielzahl von Untersuchungen belegte, dass der Zustand des endothelialen Mikrofilamentsystems eine wichtige Rolle für diese Regulation spielt (11;151;202;220;221). Kleine GTP-bindende Rho-Proteine wurden als zentrale Schaltmoleküle in der Organisation des Zytoskeletts erkannt (213). Große clostridale Zytotoxine modifizieren GTPasen durch kovalente Modifikation; *C. difficile* Toxin B-10463 blockiert RhoA, Rac1 und Cdc42 durch Glukosylierung (5;6;103-105).

Nachdem wir die Glukosylierung von Rho-Proteinen durch TcdB-10643 in Endothelzellen verifiziert hatten, prüften wir die Hypothese, dass TcdB-10463-induzierte Hemmung der Rho-Proteine endotheliale Permeabilität erhöht (**3 H**). Bei gleichzeitigem Abfall des endothelialen F-Aktins führte TcdB-10463 zu einem zeit- und dosisabhängigen Kollaps der endothelialen Barrierefunktion (Anstieg der Wasserfiltration, Abfall des Albuminreflektions-Koeffizienten). Der Verlust der Permselektivität war von der Ausbildung parazellulärer Lücken begleitet.

Die gleichzeitige Hemmung der drei GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 durch TcdB-10643 führte auch in einer Studie von Adamson et al. (2) zu einem Verlust an Aktin-Stressfasern sowie von endothelialer Hyperpermeabilität *in vivo* und *in vitro*.

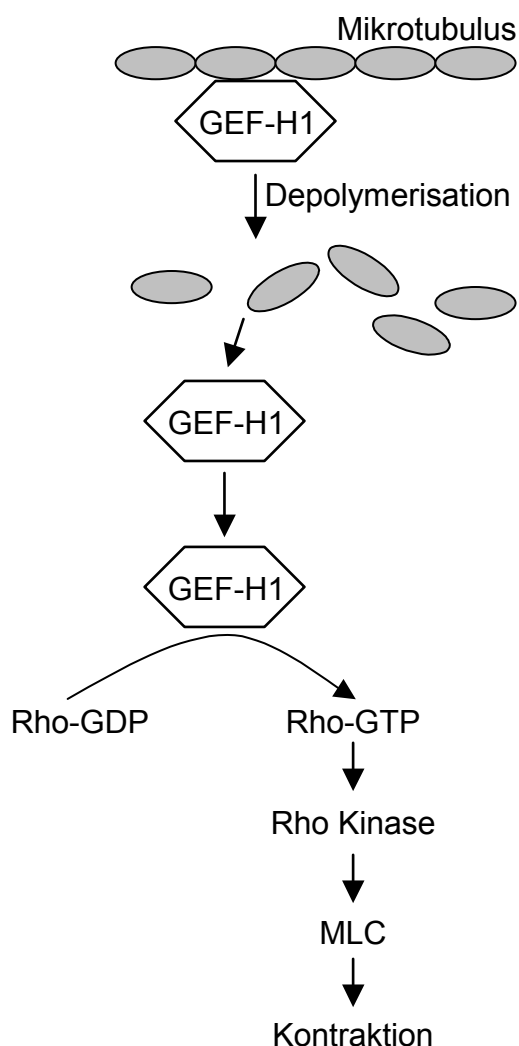
Zusätzlich zeigten die Autoren, dass in den TcdB-01643 behandelten Zellen das junctionale VE-Cadherin verloren ging. Für die endotheliale Hyperpermeabilität nach TcdB-10643 scheint am ehesten die Blockade von Rac1 verantwortlich zu sein (237): Die Expression von dominant-negativem Rac1 mittels viraler Vektoren induzierte spontan endotheliale Hyperpermeabilität. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung von RhoA in mehreren Studien zur Steigerung der Permeabilität (35;150;151;220;221). Dies bedeutet, dass u.U. den einzelnen GTPasen gegensätzliche Funktionen (in Endothelzellen) zukommen können. Zur Verkomplizierung der Analyse von Rho-Proteinen trägt auch die Beobachtung bei, dass die Effekte der Rho-Proteine auf das Zytoskelett zwischen verschiedenen Zellarten variieren können (213). Von erheblichem Einfluss auf die Analyse ist weiterhin das Vorgehen in der Untersuchung: So scheint es ein wesentlicher Unterschied zu sein, ob in primären Zellkulturen normotop exprimierte Rho-Proteine am Ort ihrer natürlichen Lokalisation blockiert werden oder ob ektopt überexprimierte Mutanten in Zelllinien Verwendung finden (213).

Insgesamt bestätigten diese Resultate die enorme Bedeutung des F-Aktinfilamentsystems für die Regulation endothelialer Permeabilität und gaben einen ersten Hinweis darauf, dass Rho-Proteine wichtige Funktionen in der Anpassung von Endothelzellfunktionen unter inflammatorischen Bedingungen haben.

Überraschenderweise führten Untersuchungen zur Rolle des Mikrotubulussystems für die Regulation der endothelialen Barrierefunktion zurück zum Mikrofilamentsystem und den Rho-Proteinen (**18 H**): Die Depolymerisation von Mikrotubuli in konfluenten Endothelzellkulturen hatte einen Verlust der endothelialen Barrierefunktion bei gleichzeitiger massiver Ausbildung von F-Aktin Stressfasern und einem Anstieg des endothelialen F-Aktingehalts zur Folge. Im Gegensatz dazu führte die Depolymerisation des F-Aktins zu keinen sichtbaren Veränderungen des Mikrotubulussystems in den Zellen. Stabilisierung der Mikrotubuli reduzierte sowohl die Ausbildung der Stressfasern als auch die endotheliale Hyperpermeabilität.

Die beschriebenen Alterationen des Mikrofilamentsystems als Folge der Mikrotubulus-Depolymerisation legen nahe, dass die beobachtete Hyperpermeabilität letztlich doch unter Einfluss des Mikrofilamentsystems auftritt. Verin et al. (225) demonstrierten, dass die Depolymerisation von Mikrotubuli zu vermehrter Phosphorylierung der Myosinleichtkette und folgender Kontraktion der Zellen führt.

Da die Depolymerisation von Mikrotubuli zur Freisetzung des GDP-Austauschfaktors GEF-H1 und damit zur Aktivierung Rho-Kinase abhängiger Phosphorylierung der Myosinleichtkette führte, schließt sich der Kreis zwischen Mikrotubulus-Depolymerisation und endothelialer Zellkontraktion und Hyperpermeabilität (Abb. 17) (119).



**Abb. 17:** An Mikrotubuli gebundener GDP-Austauschfaktor GEF-H1 ist inaktiv. Durch Depolymerisation der Mikrotubuli freigesetztes, aktives GEF-H1 kann über die Aktivierung Rho-abhängiger Mechanismen zur Kontraktion von Endothelzellen und folgender Hyperpermeabilität führen.

Ob inflammatorische Stimuli indirekt die Zellkontraktion über Perturbation der Mikrotubuli herbeiführen, müssen weitere Studien klären. Interessanterweise kann die Polymerisation der Mikrotubuli auf die Freisetzung von NO, PGE<sub>2</sub> oder PGI<sub>2</sub> Einfluss nehmen und Migrationsprozesse der Endothelzellen regulieren (76;126). Insgesamt deuten diese Experimente auf eine potentiell wichtige, bislang wenig untersuchte Rolle der Mikrotubuli unter inflammatorischen Bedingungen in Endothelzellen hin.



### 5.3 Transzelluläre endotheliale Permeabilität

Neben parazellulärer Permeabilität kann - insbesondere unter hypoxischen Bedingungen - transzelluläre Permeabilität auftreten (62;63;72). Für die Induktion dieser speziellen Hyperpermeabilität, die bei geschlossenen Zell-Zell-Verbindungen beobachtet wird, kommt dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, früher auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor, VPF, bekannt) besondere Bedeutung zu (77;175;193). Zunächst war unklar, ob VEGF seine Wirkung direkt am Endothel ausübt oder durch die Aktivierung anderer Zellen.

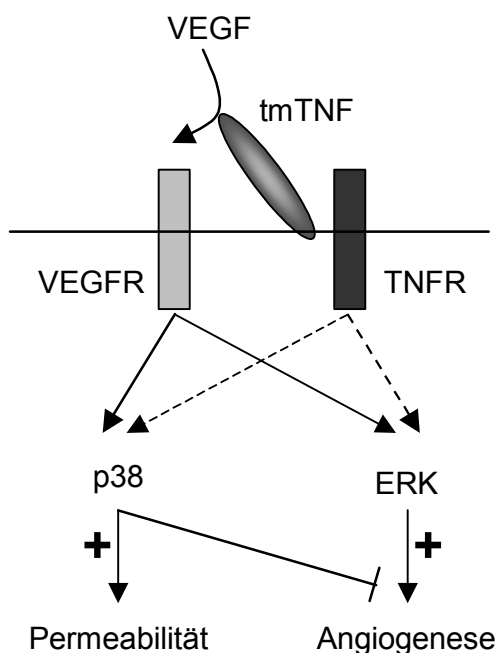
Wir demonstrierten, dass VEGF durch direkte Einwirkung auf Endothelzellen endotheliale Permeabilität erhöht (**7 H**). Auffällig war einerseits die schnelle Aktivierung der Zellen durch VEGF (P-Selektin-Expression, Bildung von Inositol-1,4,5-Phosphat) innerhalb von Minuten und andererseits der Permeabilitätsanstieg nach einer Verzögerung von ca. 150 min nach Stimulation. Im Gegensatz dazu riefen zwei Endothelzell-unspezifische Mitogene („*platelet-derived growth factor*“, PDGF; „*granulocyte-monocyte derived colony stimulated factor*, GM-CSF) diesen Effekt nicht hervor. VEGF-Exposition der Endothelzellen hatte die Translokation von Wasser und Makromolekülen (Albumin) über den endothelialen Monolayer bei (elektronenmikroskopisch) geschlossenen Zell-Zell Verbindungen auf den Filtermembranen zur Folge (**7 H**).

Zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* bestätigten diesen Effekt auf die endotheliale Permeabilität (63;72). Interessanterweise war in manchen Gefäßbetten, wie z.B. der Haut, ein schneller VEGF induzierter Permeabilitätsanstieg nachweisbar, während in anderen die Filtration mit deutlicher Verzögerung anstieg (13;62;63;71;72). Darüber, ob neben Endothelzellen andere Zellen zu diesem Effekt beitragen oder verschiedene Endothelzellen unterschiedlich reagieren, kann bislang nur spekuliert werden.

Eigene, fortführende Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* demonstrierten eine zentrale Bedeutung von tmTNF und p38 MAP Kinase für VEGF induzierte Permeabilität (Abb. 18) (**11 H, 15 H**): Die Expression von tmTNF auf der Oberfläche von Endothelzellen war für VEGF-induzierte Hyperpermeabilität, nicht jedoch für VEGF-assoziierte Proliferation notwendig. Unstimulierte Endothelzellen exprimieren bereits geringe Mengen von tmTNF auf der Zelloberfläche. Diese Expression resultierte in erhöhter basaler Aktivität der p38 MAP Kinase und von NF- $\kappa$ B (**11 H, 15**

**H).** Hemmung der p38 MAP Kinase blockierte den VEGF-induzierten Permeabilitätsanstieg *in vivo* und *in vitro* ebenso effektiv wie die Blockade des tmTNF. Die Expression von tmTNF ging mit einer erhöhten Expression von Gewebefaktor („*tissue factor*“) und IL-6 einher, welche sich gut mit der beobachteten NF- $\kappa$ B Aktivität erklären lässt (41;236). Grundsätzlich liegen wesentlich weniger Erkenntnisse über die Rolle von tmTNF (in Endothelzellen) als über lösliches TNF vor. Transgene Mäuse, die eine unspaltbare Form von tmTNF unter der Kontrolle des Endothel-spezifischen tie2-Promotors exprimieren, zeigten eine chronisch-inflammatorische Aktivierung in Leber und Niere (236). Wie sich diese Tiere in Infektion und Inflammation verhalten, ist bislang nicht untersucht.

Die bislang bekannten Effekte der p38 MAP Kinase auf endotheliale Permeabilität beziehen sich auf parazelluläre Permeabilität und die Phosphorylierung junctionaler Proteine (78;108;113;152;154). Wie eine Verknüpfung der Kinase mit Mechanismen transzellulärer Permeabilität aussehen könnte, ist offen. Bates et al. (14) formulierten eine Hypothese, in der VEGF-induzierte Bildung von Diazylglyzerol durch Aktivierung von Kationen-Kanälen transzelluläre Permeabilität induziert. Allerdings wird auch in dieser Hypothese keine mögliche, prüfbare molekulare Verbindung zu Fenestrae und VVO aufgezeigt. Insgesamt sind sowohl die Signalwege zur Induktion von Fenestrae als auch die Natur der VVOs weitgehend unerforscht.



**Abb. 18:** Vereinfachte Darstellung des VEGF-Signalweges zu Permeabilität und Angiogenese. Aktivierung der p38 MAP Kinase erhöht Permeabilität und hemmt Angiogenese. Blockade von tm-TNF inhibiert ebenso VEGF induzierte endotheliale Hyperpermeabilität. Aktivierung von ERK stimuliert die Angiogenese.

Eine weitere Dichotomie im Signalweg zu Vaskulogenese und Hyperpermeabilität fand sich in der intrazellulären Signaltransduktion (Abb. 18) (**15 H**): Während Blockade der p38 MAP Kinase *in vitro* und *in vivo* endotheliale Permeabilität blockierte, induzierte sie gleichzeitig Angiogenese *in vitro* und *in vivo*. Dieser Prozess war begleitet von verlängerter ERK1/2-Aktivität und erhöhter Plasminogen Bildung sowie verringerter endothelialer Apoptose.

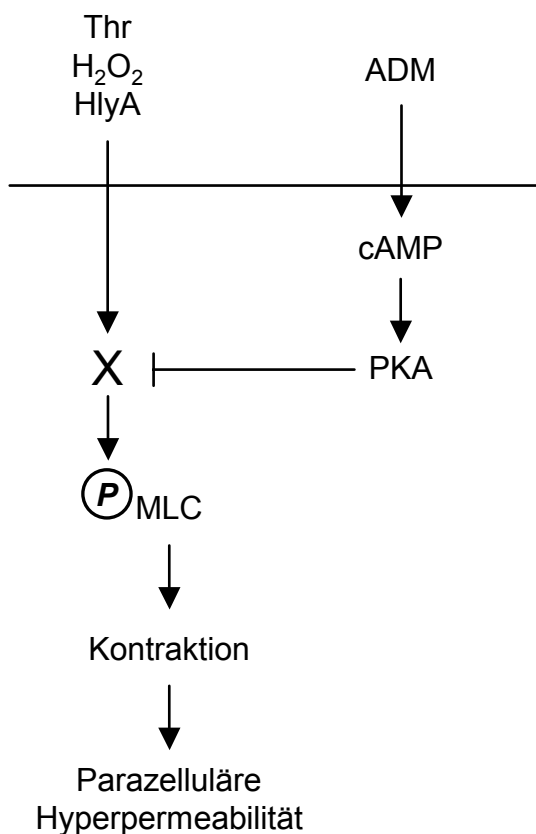
Die p38 MAP Kinase könnte also ein „molekularer Schalter“ zwischen Angiogenese und Hyperpermeabilität wirken. Experimente, die die VEGF-assoziierte Permeabilität unter inflammatorischen Bedingungen untersuchen und die Hypothese adressieren, dass VEGF-induzierte Angiogenese zur Regeneration inflammatorisch geschädigter Gewebe beiträgt, stehen aus.

#### 5.4 Therapie der endothelialen Schrankenstörung

Neben dem direkten Eingriff in zur Hyperpermeabilität führende Signalpfade erwies sich die Erhöhung zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP) als wirkungsvolle Methode zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion (190;207;212) (**2 H, 7 H, 12 H**). Die intrazellulären Spiegel dieser Signalmoleküle sind von der Bildung der Nukleotide durch Adenyl- oder Guanylylzyklasen einerseits und der hydrolytischen Spaltung der zyklischen Nukleotide durch Phosphodiesterasen (PDE) andererseits abhängig (68;199). In Endothelzellen entwertet die PDE2 primär cGMP, die PDE3/4 cAMP (207;212) (**2 H, 12 H**). Simultane Stimulation der Bildung der Nukleotide bei gleichzeitiger Inhibition der spezifischen PDEs erwies sich als besonders effektive Maßnahme zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion *in vitro* (207;212) und *in vivo* (190) (**2 H, 12 H**).

Auf die hohe potentielle Bedeutung dieses Barriere-protectiven Mechanismus weisen aktuelle Untersuchungen zu dem endogenen Peptid Adrenomedullin (ADM) hin (**12 H**): ADM erhöht in Zielzellen, einschließlich Endothelzellen, cAMP (94). Mäuse mit funktionslosem ADM-Gen starben *in utero* mit einem massiven Hydrops fetalis (37). Eigene Experimente demonstrierten, dass ADM die endotheliale Barrierefunktion gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Thrombin- und *E. coli* Hämolysin-induzierter Hyperpermeabilität schützt. Darüber hinaus reduzierte ADM Ödembildung in isolierten Kaninchenlungen. ADM blockierte durch cAMP abhängige Mechanismen

die Phosphorylierung der Myosinleichtkette und damit die Zellkontraktion, interzelluläre Lückenbildung und parazelluläre Flüssigkeitsfiltration (**12 H**).



**Abb. 19:** ADM stabilisiert die endotheliale Barrierefunktion durch Blockade der MLC-Phosphorylierung. An welcher Stelle die ADM induzierten, cAMP-abhängigen Mechanismen in die proximalen, zur Hyperpermeabilität führenden Signalpfade eingreifen, ist unbekannt.

Vor dem Hintergrund, dass Mäuse, die ADM in ihrem Gefäßsystem überexprimierten, resistent gegenüber einem Endotoxinschock waren (194), könnte ADM eine wesentliche, vasoprotektive Rolle im Rahmen systemischer Inflammation zukommen. Im Verlauf septischer Erkrankungen kam es zu einer verringerten vaskulären Antwortfähigkeit auf ADM (117;244). Einige Untersuchungen machten eine verringerte Expression von ADM Rezeptoren für diesen Effekt verantwortlich (155-157). Die Zugabe von Komplement Faktor H, dem primären ADM-bindenden Protein (163), restaurierte die vaskuläre Antwortfähigkeit gegenüber ADM (164). Ob ADM tatsächlich einen generellen permeabilitätsregulierenden Faktor und ein potientes therapeutisches Agens zur Therapie endothelialer Schrankenstörungen darstellt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Neben parazellulärer Permeabilität wurde auch VEGF-induzierte Permeabilität durch die Erhöhung zyklischer Nukleotide blockiert (G 1-7).

## 5.5 Aktivierung von Endothelzellen durch Bakterien und bakterielle Produkte

Als Barriere zwischen Blut und Gewebe ist das Endothel Zielzelle einer Vielzahl teils sehr unterschiedlicher Angriffstrategien von Pathogenen. Porenbildende Exotoxine sind hochpotente bakterielle Virulenzfaktoren (17-19). Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Poren-bildenden Exotoxine *E. coli* HlyA und *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin die Adhäsion von PMN an Endothelzellen durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen erhöhen (**1 H**). *In vivo* Untersuchungen in der mesenterialen Mikrozirkulation von Ratten verifizierten den Effekt von *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin auf die Rekrutierung von PMN (170): In diesem Modell war eine  $\alpha$ -Toxin induzierte P-Selektin Expression und PMN-Endothel Interaktion nachweisbar. Gleichlaufende Ergebnisse erbrachten Experimente mit  $\alpha$ -Toxin-exponierten Aortenringen der Ratte (28). Interessanterweise induzierte das Toxin in isolierten Rattenherzen eine zusätzliche, offenbar ICAM-1 gesteuerte Rekrutierung von PMN (85).

Untersuchungen zur *E. coli* HlyA-vermittelten Aktivierung der PMN-Endothel Interaktion liegen nicht in diesem Umfang vor. Obwohl nur HlyA, nicht jedoch *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin, die Expression leukozytärer Adhäsionsmoleküle induzierte (**1 H**), führen beide Toxine zur weitreichenden Stimulation von PMN und Makrophagen (Sauerstoffradikal-Produktion, Liberierung von Lipoxxygenasenprodukten) (88;177;211). Insgesamt kann angenommen werden, dass diese massive Aktivierung beider Reaktionspartner eine verstärkte Interaktion auch *in vivo* zur Folge hat.

Neben der Expression der „klassischen“ Adhäsionsmoleküle führten sowohl HlyA als auch *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin in unseren Untersuchungen zur starken Bildung von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) auf Endothelzellen. PAF, das membranständig auf der Oberfläche von Endothelzellen nach Stimulation exponiert wird, kann durch die Bindung des PMN-ständigen PAF Rezeptors die Interaktion zwischen den Zellen verstärken (168;245). Entsprechend dieser Theorie blockierte ein PAF-Rezeptorantagonist (BN50727) wirkungsvoll die Endothel-PMN Interaktion (**1 H**).

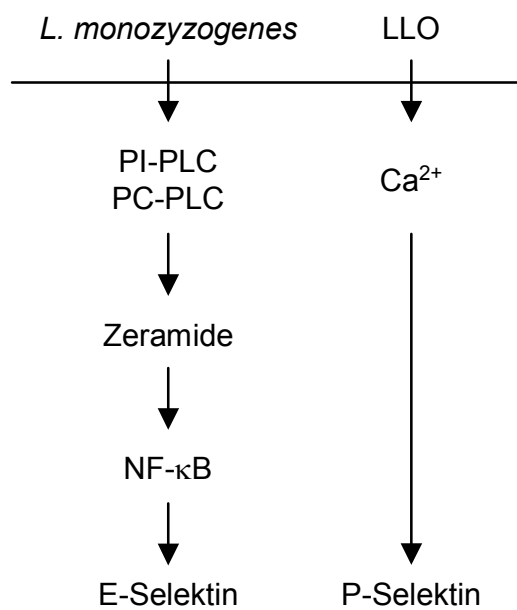
Beide Exotoxine führten *in vitro* und *in vivo* zu durch das Endothel geprägten proinflammatorischen Reaktionen: Die Synthese von z.B. PAF, NO und Leukotrienen, induziert durch Toxin bedingten  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zellen, kann die entzündliche Reaktion aggravieren und durch systemische Wirkungen zu Hypotension führen (28;85-87;205;206;210). Darüber hinaus bewirkten beide Toxine einen Kollaps der endothelialen Barrierefunktion *in vitro* (205) (**2 H, 12 H**) und *in vivo*

(141;188;189;191;205). Die zusätzliche, Toxin induzierte Rekrutierung der PMN und folgende Mediatorfreisetzung durch diese Zellen ist in der Lage, die Entzündung weiter zu perpetuieren.

Insgesamt induzieren diese Toxine eine massive proinflammatorische Reaktion der Endothelzellen und stellen ihre Potenz als bakterielle Virulenzfaktoren eindrucksvoll dar. Daher ist die Veröffentlichung von Prüfer et al. (170) bemerkenswert, in der ein schützender Effekt von Statinen (Simvastatin) vor *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin induzierter Inflammation in der Mikrozirkulation der Ratte demonstriert wurde.

Neben diesen sekretorischen Produkten wirken auch „komplette“ Bakterien auf das Endothel ein. Eine große Anzahl an Pathogenen invadiert zumindest kurzfristig das Endothel. Dabei ist häufig weder der Ablauf des Prozesses bekannt noch dessen Bedeutung für den weiteren Verlauf der Erkrankung (z.B. bei *S. pneumoniae*) (48;173). Ein Teil der Bakterien durchwandert unter Inanspruchnahme endothelialer Transportmechanismen das Endothel, um in andere Kompartimente zu gelangen (z.B. *N. meningitidis* an der Blut-Hirn Schranke) (149). Eigene Experimente fokussierten auf die Interaktion von Endothelzellen mit Bakterien, die zumindest zeitweise im Endothel parasitieren und replizieren.

Unsere Untersuchungen demonstrierten, dass *L. monocytogenes* die klassischen Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in Endothelzellen hochreguliert (**4 H, 5 H**). Im Gegensatz dazu hatte der apathogene *L. innocua* Stamm, der als Kontrolle fungierte, keinen solchen Effekt. Unter Einsatz von gereinigtem Listeriolysin (LLO) und genetisch manipulierten Listerien, die kein LLO mehr produzieren, zeigte sich eine LLO Abhängigkeit der P-Selektin Expression (Abb. 20). Da LLO zu einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  in Endothelzellen führte, mag am ehesten die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Exozytose von P-Selektin aus Weibel-Palade Körperchen diesem Effekt zugrunde liegen (23). Die LLO-Deletionsmutanten induzierten jedoch weiterhin die Expression der anderen Adhäsionsmoleküle. Als Konsequenz war vermehrte Adhärenz von PMN an die infizierten Endothelzellen darstellbar (**4 H, 5 H**). Experimente mit blockierenden Antikörpern zeigten, dass insbesondere E-Selektin und ICAM-1 auf Seiten des Endothels und  $\beta_2$ -Integrine auf Seiten der PMN an der Interaktion beteiligt waren.



**Abb. 20:** Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle durch listerielle Pathogenitätsfaktoren. Während die Expression von P-Selektin durch Listerilysin O (LLO)  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig erfolgt, aktivieren listerielle Phospholipasen (PLC) durch Zeramidbildung E-Selektin Expression.

Diese phänomenologischen Beobachtungen lieferten die Grundlage für Experimente, die mit Hilfe weiterer listerieller Deletionsmutanten die zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen analysierten (5 H). Listerien exprimieren eine Phosphatidyl-Inositol spezifische PLC (PI-PLC) und eine Phosphatidyl-Cholin spezifische PLC (PC-PLC) (45;224). Mit Hilfe von isogenen Deletionsmutanten des Wildtyps (EGD) für die PC-PLC ( $\text{EGD}\Delta p/cA$ ) und die PI-PLC ( $\text{EGD}\Delta p/cB$ ) untersuchten wir die Bedeutung der PLC für die Expression von E-Selektin. Beide Mutanten reduzierten die Protein und mRNA Expression von E-Selektin signifikant. In Folge war das Rollen und Adhären von PMN an Endothelzellen ebenfalls deutlich vermindert. Die bakteriellen PLC aktivierten eine massive Zeramidbildung und subsequente Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Endothelzellen. Offensichtlich interferieren diese bakteriellen Pathogenitätsfaktoren direkt mit Signalwegen der Wirtszelle.

Eine Vielzahl von weiteren Pathogenen, die u.a. das Endothel attackieren, unter ihnen *S. aureus*, *Rickettsia prowazekii* und der Endothelzellen invadierende Pilz *Candida albicans*, setzten PLCs als Pathogenitätsfaktoren frei (80;184). In Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen induzierte die PLC von *Clostridium perfringens* die Expression von endotheliale ICAM-1 und darüber hinaus IL-8 (27). Allerdings stehen in vielen Fällen weder die gereinigten PLC noch entsprechende

Deletionsmutanten zur Verfügung, so dass die Untersuchung der molekularen Mechanismen noch aussteht.

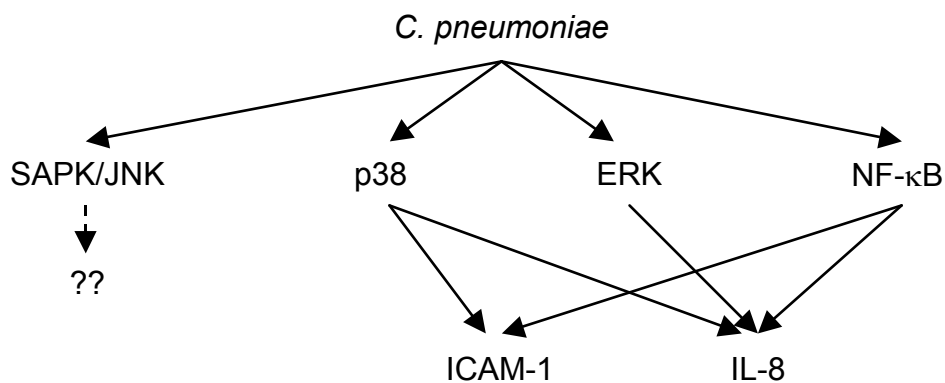
Wenngleich eine einfache Übertragung von Experimenten mit anderen Zellen auf Endothelzellen nicht möglich ist, liefern sie doch wertvolle Hinweise auf potentiell bedeutende Signalwege im Endothel: Das listerielle Oberflächenprotein InlB wurde - neben Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) - als Ligand der Rezeptor-Tyrosin Kinase Met identifiziert (44). Ob und welche Bedeutung Internalin B induzierte Aktivierung der Phosphotidyl-Inositol-3 Kinase und Akt Kinase für die Ausprägung des proinflammatorischen Phänotyps von Endothelzellen hat, ist unbekannt (135). Vor dem Hintergrund der Arbeit von Lehner et al. (127) könnte die Untersuchung des p38 MAP Kinasen Signalpfades wichtige Erkenntnisse im Zusammenhang mit listerieller Endothelzellaktivierung erbringen: MK2-defiziente Mäuse, die ihren p38 Signalweg nur noch eingeschränkt aktivieren können, zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektion mit *L. monocytogenes*.

Bislang bleibt offen, ob chronische Infektion mit *C. pneumoniae* (von Endothelzellen) an der Entstehung von Arteriosklerose kausal beteiligt ist, als Risikofaktor mitwirkt oder bestehende Läsionen zusätzlich verschlimmert (61;128). Da die Rekrutierung von Leukozyten (Granulozyten, Monozyten) wesentlich zur Bildung inflammatorischer Läsionen der Gefäßwand beitragen kann, untersuchten wir die Effekte von Chlamydien auf die Interaktion der Endothelzellen mit Mono- und Granulozyten (**8 H**). *C. pneumoniae* induzierte die Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1) mit der Folge von vermehrtem Rollen, Adhären und Transmigrieren von Mono- und Granulozyten an/durch endotheliale Monolayer. Offensichtlich kann die Aktivierung von Endothelzellen durch *C. pneumoniae in vitro* hocheffizient Leukozyten rekrutieren. Ob diese Aktivierung auch *in vivo* nachweisbar ist und ob sie nur in der ersten, akuten Phase der Infektion besteht oder aber persistiert, muss noch geprüft werden. *In vitro* war in unseren Experimenten eine starke, bis zum Ende des Versuchszeitraums von 72 h andauernde, Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nachweisbar.

In ersten Untersuchungen adressierten wir die Aktivierung wesentlicher proinflammatorischer Signalwege in *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen (Abb. 21) (**8 H**, **19 H**): Der Kontakt mit *C. pneumoniae* führte (unabhängig von chlamydialem LPS) zur minutenschnellen Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, p38



MAPK und c-Jun NH<sub>2</sub> Kinase. Blockade der p38 MAP Kinase oder ERK reduzierte die Chlamydien-assoziierte Expression von IL-8, während die Oberflächenexposition von ICAM-1 nur von der p38 MAP Kinase abhängig war. Da die beobachtete Aktivierung der Kinasen von LPS unabhängig war, könnte, wie in der Untersuchung von Sasu et al. (181) für glatte Gefäßmuskelzellen gezeigt, das chlamydiale Hitzeschock Protein 60 den Effekt hervorrufen.



**Abb. 21:** Die Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* führt zur Aktivierung zahlreicher, bedeutender Signalpfade in den Endothelzellen mit der Folge einer pro-inflammatorischen Genexpression. Die Verknüpfung der Signalpfade ist z.Z. noch unklar.

Es liegen bislang erst wenige Untersuchungen zur Aktivierung dieser wichtigen Signalwege durch Bakterien in Endothelzellen vor, die meisten Untersuchungen fokussierten auf LPS-induzierten Signalen. Untersuchungen mit *Porphyromonas gingivalis*, einem etiologisch bedeutsamen Erreger der Parodontitis demonstrierten, dass - je nach Situation - eine agonistische und antagonistische Funktion für die p38 MAP Kinase-Aktivierung in Endothelzellen durch ein Bakterium wahrgenommen werden kann (49). Weit über die Regulation proinflammatorischer Gene hinaus kann die Aktivierung dieser Kinasen Einfluss auf wesentliche Grundfunktionen der Zellen wie Apoptose oder Migration nehmen (39;57). Im Zusammenhang mit chlamydialer Infektion von Endothelzellen sind diese jedoch bislang nicht eingehend untersucht, auch für andere bedeutende Keime liegen allenfalls fragmentarische Erkenntnisse vor.

Innerhalb von 30-60 min war die nukleäre Translokation und verstärkte DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B, nach 4 h die starke Expression eines NF- $\kappa$ B abhängigen Reportergens in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen nachweisbar (**8 H**). Übereinstimmend fand sich eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems auch in anderen, Chlamydien-infizierten Zelltypen (32). Diese Aktivität von NF- $\kappa$ B kann wesentlich zur proinflammatorischen Transformation der (Endothel)zellen beitragen. Die Beobachtung, dass Aspirin die Chlamydien-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die Expression proinflammatorischer Zytokine als auch chlamydiale Replikation blockiert, lässt auf eine zentrale Rolle NF- $\kappa$ B-abhängiger Prozesse für die Pathogenese der Chlamydieninfektion schließen (217). Darüber hinaus induziert der Transkriptionsfaktor die Expression anti-apoptotischer Genprodukte in Endothelzellen (z.B. „Inhibitors of apoptosis“, IAP) (51;241). In der Literatur liegen Berichte über sowohl pro- (84;159) als auch anti-apoptotische Effekte (3;38;75) von Chlamydien vor, eingehende Untersuchungen zu Endothelzellen stehen aus. Interessanterweise können *Chlamydia ssp.* ein Protein („*Chlamydia protein associating with death domains*“, CADD) exprimieren, welches mit Proteinen der Todesrezeptoren interagiert (201).

Das Endothel ist eine spezifische Zielzelle von *B. henselae* und die Infektion von Endothelzellen stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Katzenkratzkrankheit und bazillären Angiomatose dar (52;53).

*B. henselae* infizierte Endothelzellen innerhalb weniger Stunden und replizierte in den Zellen (**10 H**). Die Infektion resultierte in Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 auf mRNA und Proteinebene. Während E-Selektin für mehrere Stunden auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar war (6-18 h), konnte ICAM-1 bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 6 Tagen vermehrt nachgewiesen werden. Blockade von NF- $\kappa$ B inhibierte die Expression der Adhäsionsmoleküle. Ein vermehrtes Rollen und Adhären von Granulozyten an Bartonellen-infizierten Endothelzellen war Folge der Adhäsionsmolekülexpression (**10 H**).

*B. henselae* exprimieren zahlreiche Proteine in ihrer äußeren Membran („*outer membrane proteins*“, OMP), deren Funktion weitgehend unbekannt ist (33). Besonders prominent ist ein 43 kDa, Porin-artiges OMP (OMP43). Nach biochemischer Präparation der OMPs zeigten wir, dass diese - ebenso wie komplette Bakterien - die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, Expression der Adhäsionsmoleküle und

verstärktes Rollen und Adhärenzen von Granulozyten an Endothelzellen induzieren (**10 H**). Demzufolge können OMP einen wesentlichen Pathogenitätsfaktor der Bartonellen darstellen.

OMP als potente Pathogenitätsfaktoren wurden auch für andere Bakterien beschrieben (234). Unklar ist, welche Strukturen auf den Endothelzellen als Rezeptoren/Akzeptoren für OMP dienen. Völlig offen ist auch, welche Rolle obengenanntem Phänomen für die Induktion der Vasoproliferation von Endothelzellen zukommt. Die Vorstellung, dass *B. henselae*, ganz ähnlich dem *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzen, über die Proliferation seines eigenen Habitats (der Wirtszelle Endothel) sein Überleben sichert, erscheint faszinierend (109).

Zunehmend wird deutlich, dass die Infektion der Wirtszellen nicht nur grundlegende Veränderungen derselben hervorruft, sondern auch fundamentale Rückwirkungen auf Genexpression und Stoffwechsel des Bakteriums hat: Nach Infektion fand man eine veränderte Genexpression in Bartonellen (110;144).

**Zusammenfassend** besitzen alle drei Bakterien (*L. monzytogenes*, *C. pneumoniae*, *B. henselae*), die Potenz, durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen die Interaktion von Entzündungszellen mit Endothelzellen zu verstärken. Gemeinsam war ebenso die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. In der Endothel-Pathogen Interaktion dieser Keime bleiben zahlreiche, wesentliche Fragen ungeklärt, die durch neuartige Ansätze adressiert werden können. So kann der Einsatz von Deletionsmutanten von *C. pneumoniae* und *B. henselae* ebenso wie die Aufreinigung von Pathogenitätsfaktoren neue Ergebnisse erbringen. Neben der globalen Analyse der Genexpression mit Hilfe von Genomics-Techniken erscheint insbesondere die Analyse des Proteoms der Bakterien/Wirtszellen mit und ohne Pathogen-Wirtsinteraktion aussichtsreich (96;110;144).

Auch ist es notwendig, die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse *in vivo* zu überprüfen. Beispielsweise ist die Rolle der einzelnen Adhäsionsmoleküle für die Interaktion von Leukozyten mit endo- und epithelialen Zellen unbestritten (36;83;142;227;246). Dennoch zeigten Experimente mit Mäusen, denen ein oder mehrere Adhäsionsmoleküle fehlten, eine erhebliche Redundanz zwischen den einzelnen Molekülen *in vivo* (29;178). Entgegen erfolgversprechenden klinischen Studien bei der Blockade der Lymphozyten-Endothel Interaktion bei z.B. Multipler Sklerose oder

Psoriasis, waren die Ergebnisse bei der Blockade der neutrophilen Adhäsion bei z.B. Myokardinfarkt und hämorrhagischem Schock insgesamt eher negativ zu beurteilen (91).

## 6 Zusammenfassung

Die vorgestellten Arbeiten adressierten drei Aspekte der inflammatorischen Endothelaktivierung: In der pro-entzündlichen Signaltransduktion der Endothelzellen konnten Rho-Proteine als zentrale Schaltmoleküle identifiziert werden (6.1). Der Verlust der endothelialen Barrierefunktion, ausgelöst durch Bakterien, bakterielle Produkte, die Wirtsantwort oder die Folgen von Hypoxie, ist wesentliches Merkmal endothelialer Funktionstörungen bei Entzündungen. Eigene Untersuchungen fokussierten auf zugrundeliegende Mechanismen und verfolgten erste therapeutische Ansätze (6.2). Die Interaktion von Endothelzellen mit Bakterien und deren Produkten kann zur Rekrutierung von Entzündungszellen durch das Endothel signifikant beitragen. Die Pathogenitätsfaktoren verschiedener Bakterien (*L. monozytogenes*, *C. pneumoniae*, *B. henselae*) wurden auf ihre Funktion in der Leukozyten-Endothel Interaktion analysiert (6.3).

### 6.1 Rho-Proteine

Zur Entwicklung neuer, innovativer rationaler Therapiestrategien ist die Kenntnis involvierter Signalwege eine Voraussetzung. Kleine GTP-bindende Rho-Proteine konnten als zentrale Schaltmoleküle in der proinflammatorischen Signaltransduktion von Endothelzellen identifiziert werden. Die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Aktivierung der Protein Kinase C (PKC), die Expression des Zytokins Interleukin 8 und der Zyklooxygenase 2 war von intakten Rho-Proteinen abhängig. Inhibition der Rho-Proteine blockierte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und subsequente NF- $\kappa$ B abhängige Genexpression. Die parallel zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgende Stimulation des p38 MAP Kinase Signalpfades war jedoch unabhängig von aktiven Rho-Proteinen und illustriert die Komplexität der involvierten Signalwege. Die genaue Einkopplung der Rho-Proteine in den LPS-TLR Signalweg ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Von grundlagenwissenschaftlichem Interesse ist die Beobachtung, dass Rho Inhibition die TNF $\alpha$ -induzierte Translokation der Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B blockiert, obwohl die zytosolischen Inhibitoren von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, degradiert werden. Mit Hilfe von Mutagenese-Techniken und massenspektrometrischen Verfahren analysieren wir zur Zeit die Bedeutung einer putativen Phosphorylierungsstelle von NF- $\kappa$ B für diesen

Prozess. Die langandauernde Blockade von RhoA reduzierte die Proteinexpression anti-apoptotischer Moleküle und induzierte Caspase 9 und 3 abhängige Apoptose von Endothelzellen. Zusammenfassend spielen Rho-Proteine eine zentrale Rolle für die pro-inflammatorische Transformation von Endothelzellen. Weiterführende Studien werden prüfen, ob die gezielte Blockade einzelner Rho-GTPasen eine selektive Beeinflussung entzündlicher Prozesse erlaubt.

## 6.2 Endotheliale Barrierefunktion

Der Verlust der endothelialen Barrierefunktion kennzeichnet akute Entzündungen. Neben Pathogenen und ihren Produkten können auch Faktoren der Wirtsantwort wesentlich zur Ausbildung endothelialer Schrankenstörungen beitragen.

Direkte (z.B. Inhibition von Rho-Proteinen) oder indirekte (z.B. Mikrotubulus-Depolymerisation) Alterationen des endothelialen Mikrofilamentsystems führen zum Verlust endothelialer Schrankenfunktion.

Als effektive Maßnahme zur Reduktion endothelialer Hyperpermeabilität erwies sich die Erhöhung zyklischer Nukleotide. Die Beobachtung, dass das bei systemischer Inflammation im Serum vermehrte endogene Peptid Adrenomedullin (ADM) die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* und *in vivo* effektiv stabilisiert, macht weitere Untersuchungen zu dessen Wirksamkeit dringlich. ADM blockierte durch Erhöhung von zyklischem cAMP die Phosphorylierung der Myosinleichtkette und die folgende Kontraktion der Endothelzellen. In aktuellen Untersuchungen überprüfen wir den therapeutischen Einsatz von Adrenomedullin *in vitro* und *in vivo*. Ob die Erhöhung zyklischer Nukleotide einen klinischen Ansatz zur Behandlung endothelialer Schrankenstörungen darstellen kann, bleibt zu klären.

Die Erkenntnis, dass VEGF induzierte transzelluläre Hyperpermeabilität entscheidend von transmembranösem (tm) TNF abhängt, rückt die Bedeutung von tmTNF neben dem meist untersuchten löslichen TNF in den Blickpunkt. Inhibition der p38 MAP Kinase blockierte VEGF-assoziierte Hyperpermeabilität und stimulierte gleichzeitig die Gefäßneubildung. Daher könnte die Gabe von VEGF bei gleichzeitiger Blockade der p38 MAP Kinase einen interessanten Ansatz zur selektiven Induktion von Angiogenese darstellen.

### 6.3 Leukozytenrekrutierung

Infektion der Endothelzellen mit *L. monozytogenes*, *C. pneumoniae*, oder *B. henselae* hatte die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle mit vermehrter Leukozyten-Endothel Interaktion zur Folge. In infizierten Zellkulturen war vermehrtes Rollen, Adhären und Transmigrieren der Entzündungszellen an/durch Endothelzellen nachweisbar. Alle drei Pathogene aktivierten NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription. Diese gleichförmige Aktivierung bringt die Frage auf, ob Endothelzellen spezifische Antworten auf Pathogene geben können oder ob stets eine unspezifische proinflammatorische Reaktion erfolgt. Hochdurchsatzverfahren (Genomics, Proteomics) erscheinen geeignet, um aus der globalen proinflammatorischen Zellantwort neue, bislang unbekannte, keimspezifische Signalwege zu extrahieren. Die bakteriellen Phospholipasen von *L. monozytogenes* konnten als bedeutende Pathogenitätsfaktoren erkannt und ihnen eine pathophysiologische Rolle zugeschrieben werden. Der Einsatz von bakteriellen Deletionsmutanten erwies sich ebenso wie der Gebrauch gereinigter Toxine (Listeriolysin, *E. coli* Hämolysin, *S. aureus*  $\alpha$ -Toxin) als potenter Ansatz zur Klärung der Bedeutung einzelner bakterieller Pathogenitätsfaktoren. Durch die Aufreinigung von *B. henselae* Membranproteinen gelang es, die grundlegende Bedeutung dieser Proteine für die Aktivierung von Endothelzellen darzustellen. Insgesamt stehen die bisherigen, fragmentarischen Kenntnisse über die Interaktion von Endothelzellen mit Bakterien und ihren Produkten im Gegensatz zur Komplexität der Ereignisse und der hohen pathophysiologischen Bedeutung dieser Pathogen-Wirtszellinteraktion.

Insgesamt erzielten wir Fortschritte im Verständnis der Funktion von Endothelzellen in der akuten Inflammation. Es wurde deutlich, dass eine Vielzahl offener Fragen von hoher pathophysiologischer und potentieller klinischer Relevanz bestehen bleiben, deren Klärung zur Entwicklung neuer, innovativer Therapiestrategien beitragen kann.

## Literatur

1. Abbassi, O., T. K. Kishimoto, L. V. McIntire, D. C. Anderson, and C. W. Smith. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin. Invest* 92: 2719-2730, 1993.
2. Adamson, R. H., F. E. Curry, G. Adamson, B. Liu, Y. Jiang, K. Aktories, H. Barth, A. Daigeler, N. Golenhofen, W. Ness, D. Drenckhahn. Rho and Rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *J Physiol.* 15: 295-308, 2002.
3. Airene, S., H. M. Surcel, J. Tuukkanen, M. Leinonen, and P. Saikku. *Chlamydia pneumoniae* inhibits apoptosis in human epithelial and monocyte cell lines. *Scand.J Immunol* 55: 390-398, 2002.
4. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2: 675-680, 2001.
5. Aktories, K. Bacterial toxins that target Rho proteins. *J Clin. Invest* 99: 827-829, 1997.
6. Aktories, K., G. Schmidt, and I. Just. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol.Chem.* 381: 421-426, 2000.
7. Alexander, J. S. and J. W. Elrod. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 200: 561-574, 2002.
8. Andor, A., K. Trulzsch, M. Essler, A. Roggenkamp, A. Wiedemann, J. Heesemann, and M. Aepfelbacher. YopE of *Yersinia*, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 3: 301-310, 2001.
9. Arbibe, L., J. P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch, and U. G. Knaus. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat.Immunol.* 1: 533-540, 2000.
10. Auer, J., R. Berent, T. Weber, and B. Eber. Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr.Med.Chem.* 9: 1831-1850, 2002.



11. Baldwin, A. L. and G. Thurston. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev.Biomed.Eng* 29: 247-278, 2001.
12. Barbieri, J. T., M. J. Riese, and K. Aktories. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18: 315-344, 2002.
13. Bates, D. O. and F. E. Curry. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol* 271: H2520-H2528, 1996.
14. Bates, D. O., N. J. Hillman, B. Williams, C. R. Neal, and T. M. Pocock. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 200: 581-597, 2002.
15. Bevilacqua, M. P., S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr., and B. Seed. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243: 1160-1165, 1989.
16. Beyaert, R., K. Heyninck, and S. Van Huffel. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem.Pharmacol.* 60: 1143-1151, 2000.
17. Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe, and M. Palmer. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolytins. *Arch.Microbiol.* 165: 73-79, 1996.
18. Bhakdi, S., F. Grimminger, N. Suttrop, D. Walmrath, and W. Seeger. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 183: 119-144, 1994.
19. Bhakdi, S., I. Walev, D. Jonas, M. Palmer, U. Weller, N. Suttrop, F. Grimminger, and W. Seeger. Pathogenesis of sepsis syndrome: possible relevance of pore-forming bacterial toxins. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 216: 101-118, 1996.
20. Bloemen, P. G., M. C. van den Tweel, P. A. Henricks, F. Engels, S. S. Wagenaar, A. A. Rutten, and F. P. Nijkamp. Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells. *Am J Respir.Cell Mol Biol.* 9: 586-593, 1993.
21. Boettner, B. and L. Van Aelst. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 286: 155-174, 2002.

22. Bogatcheva, N. V., J. G. Garcia, and A. D. Verin. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc.)* 67: 75-84, 2002.
23. Bonfanti, R., B. C. Furie, B. Furie, and D. D. Wagner. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73: 1109-1112, 1989.
24. Boquet, P. Small GTP binding proteins and bacterial virulence. *Microbes.Infect.* 2: 837-843, 2000.
25. Branger, J., B. B. van den, S. Weijer, J. Madwed, C. L. Bos, A. Gupta, C. L. Yong, S. H. Polmar, D. P. Olszyna, C. E. Hack, S. J. van Deventer, M. P. Peppelenbosch, and P. T. van der. Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *J Immunol* 168: 4070-4077, 2002.
26. Brekken, R. A. and P. E. Thorpe. Vascular endothelial growth factor and vascular targeting of solid tumors. *Anticancer Res* 21: 4221-4229, 2001.
27. Bryant, A. E. and D. L. Stevens. Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect.Immun.* 64: 358-362, 1996.
28. Buerke, M., U. Sibelius, U. Grandel, U. Buerke, F. Grimminger, W. Seeger, J. Meyer, and H. Darius. *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasocontraction and endothelial dysfunction. *Shock* 17: 30-35, 2002.
29. Bullard, D. C. Adhesion molecules in inflammatory diseases: insights from knockout mice. *Immunol Res* 26: 27-33, 2002.
30. Bullard, D. C., E. J. Kunkel, H. Kubo, M. J. Hicks, I. Lorenzo, N. A. Doyle, C. M. Doerschuk, K. Ley, and A. L. Beaudet. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp.Med.* 183: 2329-2336, 1996.
31. Bullard, D. C., L. Qin, I. Lorenzo, W. M. Quinlin, N. A. Doyle, R. Bosse, D. Vestweber, C. M. Doerschuk, and A. L. Beaudet. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin.Invest* 95: 1782-1788, 1995.

32. Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, H. Karahashi, K. S. Michelsen, O. Equils, S. G. Morrison, R. P. Morrison, and M. Ardit. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 168: 1435-1440, 2002.
33. Burgess, A. W. and B. E. Anderson. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb.Pathog.* 25: 157-164, 1998.
34. Cameron, L. A., P. A. Giardini, F. S. Soo, and J. A. Theriot. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat.Rev.Mol Cell Biol.* 1: 110-119, 2000.
35. Carbajal, J. M., M. L. Gratrix, C. H. Yu, and R. C. Schaeffer, Jr. ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 279: C195-C204, 2000.
36. Carlos, T. M. and J. M. Harlan. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101, 1994.
37. Caron, K. M. and O. Smithies. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 615-619, 2001.
38. Carratelli, C. R., A. Rizzo, M. R. Catania, F. Galle, E. Losi, D. L. Hasty, and F. Rossano. *Chlamydia pneumoniae* infections prevent the programmed cell death on THP-1 cell line. *FEMS Microbiol.Lett.* 215: 69, 2002.
39. Chang, L. and M. Karin. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.
40. Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat.Med.* 8: 687-693, 2002.
41. Clauss, M., M. Grell, C. Fangmann, W. Fiers, P. Scheurich, and W. Risau. Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett.* 390: 334-338, 1996.
42. Coghlan, M. P., M. M. Chou, and C. L. Carpenter. Atypical protein kinases C - lambda and -zeta associate with the GTP-binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol Cell Biol.* 20: 2880-2889, 2000.

43. Cornelis, G. R. The Yersinia Ysc-Yop 'Type III' weaponry. *Nat.Rev.Mol Cell Biol.* 3: 742-754, 2002.
44. Cossart, P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 9: 105-107, 2001.
45. Cossart, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int.J Med.Microbiol.* 291: 401-409, 2002.
46. Cossart, P. and H. Bierne. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr.Opin.Immunol* 13: 96-103, 2001.
47. Coughlin, S. R. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb.Haemost.* 86: 298-307, 2001.
48. Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, and E. I. Tuomanen. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435-438, 1995.
49. Darveau, R. P., S. Arbabi, I. Garcia, B. Bainbridge, and R. V. Maier. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infect.Immun.* 70: 1867-1873, 2002.
50. de Fougerolles, A. R., S. A. Stacker, R. Schwarting, and T. A. Springer. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp.Med.* 174: 253-267, 1991.
51. De Martin, R., M. Hoeth, R. Hofer-Warbinek, and J. A. Schmid. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 20: E83-E88, 2000.
52. Dehio, C. Interactions of *Bartonella henselae* with vascular endothelial cells. *Curr.Opin.Microbiol.* 2: 78-82, 1999.
53. Dehio, C. Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 9: 279-285, 2001.
54. Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, and C. Lanz. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* 110: 2141-2154, 1997.

55. Dejana, E., R. Spagnuolo, and G. Bazzoni. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb.Haemost.* 86: 308-315, 2001.
56. Desagher, S. and J. C. Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369-377, 2000.
57. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. MAP kinases in the immune response. *Annu.Rev.Immunol* 20: 55-72, 2002.
58. Drevets, D. A. *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect.Immun.* 66: 232-238, 1998.
59. Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect.Immun.* 63: 4268-4276, 1995.
60. Drier, E. A., L. H. Huang, and R. Steward. Nuclear import of the Drosophila Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes Dev.* 13: 556-568, 1999.
61. Dugan, J. P., R. R. Feuge, and D. S. Burgess. Review of evidence for a connection between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic disease. *Clin.Ther.* 24: 719-735, 2002.
62. Dvorak, A. M. and D. Feng. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem.Cytochem.* 49: 419-432, 2001.
63. Dvorak, A. M., S. Kohn, E. S. Morgan, P. Fox, J. A. Nagy, and H. F. Dvorak. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc.Biol.* 59: 100-115, 1996.
64. Earnshaw, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68: 383-424, 1999.
65. Edfeldt, K., J. Swedenborg, G. K. Hansson, and Z. Q. Yan. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105: 1158-1161, 2002.

66. Elices, M. J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, and R. R. Lobb. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60: 577-584, 1990.
67. Ermert, L., H. Bruckner, D. Walmrath, F. Grimminger, K. Aktories, N. Suttorp, H. R. Duncker, and W. Seeger. Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs. *Am.J.Physiol* 268: L753-L761, 1995.
68. Essayan, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin.Immunol* 108: 671-680, 2001.
69. Essler, M., J. M. Staddon, P. C. Weber, and M. Aepfelbacher. Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. *J.Immunol.* 164: 6543-6549, 2000.
70. Fein, A. M. and M. G. Calalang-Colucci. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* 16: 289-317, 2000.
71. Feng, D., J. A. Nagy, J. Hipp, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp.Med.* 183: 1981-1986, 1996.
72. Feng, D., J. A. Nagy, K. Pyne, I. Hammel, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation.* 6: 23-44, 1999.
73. Ferrara, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol.Med.* 77: 527-543, 1999.
74. Ferrara, N., K. Houck, L. Jakeman, and D. W. Leung. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr.Rev.* 13: 18-32, 1992.
75. Fischer, S. F., C. Schwarz, J. Vier, and G. Hacker. Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect.Immun.* 69: 7121-7129, 2001.

76. Flusberg, D. A., Y. Numaguchi, and D. E. Ingber. Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol Biol.Cell* 12: 3087-3094, 2001.
77. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1: 27-31, 1995.
78. Garcia, J. G., P. Wang, K. L. Schaphorst, P. M. Becker, T. Borbiev, F. Liu, A. Birukova, K. Jacobs, N. Bogatcheva, and A. D. Verin. Critical involvement of p38 MAP kinase in pertussis toxin-induced cytoskeletal reorganization and lung permeability. *FASEB J* 16: 1064-1076, 2002.
79. Geyer, M. and A. Wittinghofer. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 7: 786-792, 1997.
80. Ghannoum, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin.Microbiol.Rev.* 13: 122-43, table, 2000.
81. Ghera, P., v. H. Hooft, J. Whelan, and J. F. DeLamarter. Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J Biol.Chem.* 267: 19226-19232, 1992.
82. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol* 16: 225-260, 1998.
83. Gonzalez-Amaro, R., F. Diaz-Gonzalez, and F. Sanchez-Madrid. Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 56: 977-988, 1998.
84. Goth, S. R. and R. S. Stephens. Rapid, transient phosphatidylserine externalization induced in host cells by infection with *Chlamydia spp.* *Infect.Immun.* 69: 1109-1119, 2001.
85. Grandel, U., M. Reutemann, L. Kiss, M. Buerke, L. Fink, E. Bournelis, M. Heep, W. Seeger, F. Grimminger, and U. Sibelius. Staphylococcal alpha-toxin provokes neutrophil-dependent cardiac dysfunction: role of ICAM-1 and cys-leukotrienes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1157-H1165, 2002.
86. Grandel, U., U. Sibelius, J. Schrickel, D. Schmidt, M. Buerke, L. Fink, E. Bournelis, M. Heep, K. Mayer, R. M. Bohle, W. Seeger, and F. Grimminger. Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of

septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Crit Care Med.* 29: 1-7, 2001.

87. Grimminger, F., F. Rose, U. Sibelius, M. Meinhardt, B. Potzsch, R. Spriestersbach, S. Bhakdi, N. Suttorp, and W. Seeger. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159: 1909-1916, 1997.
88. Grimminger, F., U. Sibelius, S. Bhakdi, N. Suttorp, and W. Seeger. *Escherichia coli* hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *J Clin. Invest* 88: 1531-1539, 1991.
89. Hack, C. E. and S. Zeerleder. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 29: S21-S27, 2001.
90. Hammerschlag, M. R. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *Eur. Respir. J* 16: 1001-1007, 2000.
91. Harlan, J. M. and R. K. Winn. Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med.* 30: S214-S219, 2002.
92. Haynes, L. M., D. D. Moore, E. A. Kurt-Jones, R. W. Finberg, L. J. Anderson, and R. A. Tripp. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 75: 10730-10737, 2001.
93. Henneke, P. and D. T. Golenbock. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med.* 30: S207-S213, 2002.
94. Hinson, J. P., S. Kapas, and D. M. Smith. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr. Rev.* 21: 138-167, 2000.
95. Hommes, D., B. B. van den, T. Plasse, J. Bartelsman, C. Xu, B. Macpherson, G. Tytgat, M. Peppelenbosch, and S. Van Deventer. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 7-14, 2002.
96. Huang, S. H., T. Triche, and A. Y. Jong. Infectomics: genomics and proteomics of microbial infections. *Funct. Integr. Genomics* 1: 331-344, 2002.



97. Hubbard, A. K. and R. Rothlein. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic.Biol.Med.* 28: 1379-1386, 2000.
98. Hynes, R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687, 2002.
99. Ishida, I., H. Kubo, S. Suzuki, T. Suzuki, S. Akashi, K. Inoue, S. Maeda, H. Kikuchi, H. Sasaki, and T. Kondo. Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells. *J Immunol* 169: 2069-2075, 2002.
100. Ishimitsu, T., A. Miyata, H. Matsuoka, and K. Kangawa. Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 243: 463-470, 1998.
101. Israel, A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* 10: 129-133, 2000.
102. Issekutz, A. C., D. Rowter, and T. A. Springer. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc.Biol.* 65: 117-126, 1999.
103. Just, I. and P. Boquet. Large clostridial cytotoxins as tools in cell biology. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 250:97-107.: 97-107, 2000.
104. Just, I., F. Hofmann, and K. Aktories. Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 250:55-83.: 55-83, 2000.
105. Just, I., F. Hofmann, H. Genth, and R. Gerhard. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int.J Med.Microbiol.* 291: 243-250, 2001.
106. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88: 3259-3287, 1996.
107. Karch, H. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin.Thromb.Hemost.* 27: 207-213, 2001.
108. Kayyali, U. S., C. M. Pennella, C. Trujillo, O. Villa, M. Gaestel, and P. M. Hassoun. Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are

- dependent on MAPK-activated protein kinase MK2. *J Biol.Chem.* 277: 42596-42602, 2002.
109. Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol.* 10: 269-275, 2002.
  110. Kempf, V. A., M. Schaller, S. Behrendt, B. Volkmann, M. Aepfelbacher, I. Cakman, and I. B. Autenrieth. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol.* 2: 431-441, 2000.
  111. Kern, D. F. and A. B. Malik. Microvascular albumin permeability in isolated perfused lung: effects of EDTA. *J Appl.Physiol* 58: 372-375, 1985.
  112. Kibbe, M., T. Billiar, and E. Tzeng. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc.Res* 43: 650-657, 1999.
  113. Kiemer, A. K., N. C. Weber, R. Furst, N. Bildner, S. Kulhanek-Heinze, and A. M. Vollmar. Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circ Res* 90: 874-881, 2002.
  114. Kjoller, L. and A. Hall. Signaling to Rho GTPases. *Exp.Cell Res.* 253: 166-179, 1999.
  115. Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 271: 531-535, 1994.
  116. Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero. Molecular epidemiology of Bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N.Engl.J Med.* 337: 1876-1883, 1997.
  117. Koo, D. J., M. Zhou, I. H. Chaudry, and P. Wang. The role of adrenomedullin in producing differential hemodynamic responses during sepsis. *J Surg.Res.* 95: 207-218, 2001.
  118. Kotlyarov, A., A. Neininger, C. Schubert, R. Eckert, C. Birchmeier, H. D. Volk, and M. Gaestel. MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat.Cell Biol.* 1: 94-97, 1999.

119. Krendel, M., F. T. Zenke, and G. M. Bokoch. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat.Cell Biol.* 4: 294-301, 2002.
120. Kyriakis, J. M. and J. Avruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81: 807-869, 2001.
121. Laufs, U. and J. K. Liao. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc.Med.* 10: 143-148, 2000.
122. Laufs, U. and J. K. Liao. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ.Res.* 87: 526-528, 2000.
123. Lawrence, M. B. and T. A. Springer. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873, 1991.
124. Lawrence, M. B. and T. A. Springer. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* 151: 6338-6346, 1993.
125. Ledebur, H. C. and T. P. Parks. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol.Chem.* 270: 933-943, 1995.
126. Lee, J. S. and A. I. Gotlieb. Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair. *Cardiovasc.Pathol* 11: 135-140, 2002.
127. Lehner, M. D., F. Schwoebel, A. Kotlyarov, M. Leist, M. Gaestel, and T. Hartung. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-deficient mice show increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 168: 4667-4673, 2002.
128. Leinonen, M. and P. Saikku. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect.Dis.* 2: 11-17, 2002.
129. Lentsch, A. B. and P. A. Ward. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 190: 343-348, 2000.
130. Levi, M., H. ten Cate, and P. T. van der. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med.* 30: S220-S224, 2002.

131. Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev.* 186: 8-18, 2002.
132. Ley, K. and T. F. Tedder. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol* 155: 525-528, 1995.
133. Li, Q. and I. M. Verma. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat.Rev.Immunol* 2: 725-734, 2002.
134. Lush, C. W. and P. R. Kvietys. Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation.* 7: 83-101, 2000.
135. Mansell, A., N. Khelef, P. Cossart, and L. A. O'Neill. Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. *J Biol.Chem.* 276: 43597-43603, 2001.
136. Mantovani, A., S. Sozzani, A. Vecchi, M. Introna, and P. Allavena. Cytokine activation of endothelial cells: new molecules for an old paradigm. *Thromb.Haemost.* 78: 406-414, 1997.
137. Marti, H. H. and W. Risau. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95: 15809-15814, 1998.
138. Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, A. R. Berendt, M. Hook, and S. J. Peacock. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol.* 3: 839-851, 2001.
139. Matsumoto, T., I. Turesson, M. Book, P. Gerwins, and L. Claesson-Welsh. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol.* 156: 149-160, 2002.
140. May, M. J. and S. Ghosh. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin.Cancer Biol.* 8: 63-73, 1997.
141. Mayer, K., B. Temmesfeld-Wollbruck, A. Friedland, H. Olschewski, M. Reich, W. Seeger, and A. F. Grimminger. Severe microcirculatory abnormalities elicited by *E. coli* hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am J Respir.Crit Care Med.* 160: 1171-1178, 1999.

142. McEver, R. P. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb.Haemost.* 86: 746-756, 2001.
143. McEver, R. P., K. L. Moore, and R. D. Cummings. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol.Chem.* 270: 11025-11028, 1995.
144. Molestina, R. E., J. B. Klein, R. D. Miller, W. H. Pierce, J. A. Ramirez, and J. T. Summersgill. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect.Immun.* 70: 2976-2981, 2002.
145. Montaner, S., R. Perona, L. Saniger, and J. C. Lacal. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J.Biol.Chem.* 273: 12779-12785, 1998.
146. Montaner, S., R. Perona, L. Saniger, and J. C. Lacal. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors. *J Biol.Chem.* 274: 8506-8515, 1999.
147. Moore, K. L., N. L. Stults, S. Diaz, D. F. Smith, R. D. Cummings, A. Varki, and R. P. McEver. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol.* 118: 445-456, 1992.
148. Muller, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 82: 521-533, 2002.
149. Nassif, X., S. Bourdoulous, E. Eugene, and P. O. Couraud. How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol.* 10: 227-232, 2002.
150. Nieuw Amerongen, G. P., S. van Delft, M. A. Vermeer, J. G. Collard, and V. W. van Hinsbergh. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ.Res.* 87: 335-340, 2000.
151. Nieuw Amerongen, G. P. and V. W. van Hinsbergh. Cytoskeletal effects of Rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 21: 300-311, 2001.
152. Niwa, K., O. Inanami, T. Ohta, S. Ito, T. Karino, and M. Kuwabara. p38 MAPK and Ca<sup>2+</sup> contribute to hydrogen peroxide-induced increase of permeability in

- vascular endothelial cells but ERK does not. *Free Radic.Res* 35: 519-527, 2001.
153. Noll, G. Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. *Atherosclerosis* 140 Suppl 1: S3-S9, 1998.
  154. Nwariaku, F. E., J. Chang, X. Zhu, Z. Liu, S. L. Duffy, N. H. Halaihel, L. Terada, and R. H. Turnage. The role of p38 map kinase in tumor necrosis factor-induced redistribution of vascular endothelial cadherin and increased endothelial permeability. *Shock* 18: 82-85, 2002.
  155. Ono, Y., I. Okano, M. Kojima, K. Okada, and K. Kangawa. Decreased gene expression of adrenomedullin receptor in mouse lungs during sepsis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 271: 197-202, 2000.
  156. Ornan, D. A., I. H. Chaudry, and P. Wang. Pulmonary clearance of adrenomedullin is reduced during the late stage of sepsis. *Biochim.Biophys.Acta* 1427: 315-321, 1999.
  157. Ornan, D. A., I. H. Chaudry, and P. Wang. Saturation of adrenomedullin receptors plays an important role in reducing pulmonary clearance of adrenomedullin during the late stage of sepsis. *Biochim.Biophys.Acta* 1586: 299-306, 2002.
  158. Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M. F. Carlier. Mechanism of actin-based motility. *Science* 292: 1502-1506, 2001.
  159. Perfettini, J. L., J. C. Reed, N. Israel, J. C. Martinou, A. Dautry-Varsat, and D. M. Ojcius. Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during Chlamydia infection. *Infect.Immun.* 70: 55-61, 2002.
  160. Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo, and J. C. Lacal. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11: 463-475, 1997.
  161. Peters, C. J. and S. R. Zaki. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med.* 30: S268-S273, 2002.
  162. Petzelbauer, P., T. Halama, and M. Groger. Endothelial adherens junctions. *J Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 5: 10-13, 2000.

163. Pio, R., T. H. Elsasser, A. Martinez, and F. Cuttitta. Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microsc.Res Tech.* 57: 23-27, 2002.
164. Poole, L. J., Y. Yu, P. S. Kim, Q. Z. Zheng, J. Pevsner, and G. S. Hayward. Altered patterns of cellular gene expression in dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol.* 76: 3395-3420, 2002.
165. Poppert, S., R. Marre, and A. Essig. Biology and clinical significance of Chlamydiae. *Contrib.Microbiol.* 8: 51-71, 2001.
166. Portnoy, D. A., V. Auerbuch, and I. J. Glomski. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol.* 158: 409-414, 2002.
167. Prasad, A., J. Zhu, J. P. Halcox, M. A. Waclawiw, S. E. Epstein, and A. A. Quyyumi. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction. *Circulation* 106: 184-190, 2002.
168. Prescott, S. M., T. M. McIntyre, and G. A. Zimmerman. The role of platelet-activating factor in endothelial cells. *Thromb.Haemost.* 64: 99-103, 1990.
169. Probert, L., K. Akassoglou, L. Alexopoulou, E. Douni, S. Haralambous, S. Hill, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis, M. Pasparakis, D. Plows, and G. Kollias. Dissection of the pathologies induced by transmembrane and wild-type tumor necrosis factor in transgenic mice. *J Leukoc.Biol.* 59: 518-525, 1996.
170. Pruefer, D., J. Makowski, M. Schnell, U. Buerke, M. Dahm, H. Oelert, U. Sibeliuss, U. Grandel, F. Grimminger, W. Seeger, J. Meyer, H. Darius, and M. Buerke. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 106: 2104-2110, 2002.
171. Rice, G. E., J. M. Munro, and M. P. Bevilacqua. Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J Exp.Med.* 171: 1369-1374, 1990.
172. Ridley, A. J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11: 471-477, 2001.
173. Ring, A., J. N. Weiser, and E. I. Tuomanen. Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin.Invest* 102: 347-360, 1998.

174. Rippe, B. and B. Haraldsson. Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev.* 74: 163-219, 1994.
175. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
176. Risau, W. and I. Flamme. Vasculogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11:73-91, 1995.
177. Rose, F., L. Kiss, F. Grimminger, K. Mayer, U. Grandel, W. Seeger, E. Bieniek, and U. Sibelius. *E. coli* hemolysin-induced lipid mediator metabolism in alveolar macrophages: impact of eicosapentaenoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L100-L109, 2000.
178. Rosenkranz, A. R. and T. N. Mayadas. Leukocyte-endothelial cell interactions - lessons from knockout mice. *Exp.Nephrol.* 7: 125-136, 1999.
179. Rossiter, H., R. Alon, and T. S. Kupper. Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med.Today* 3: 214-222, 1997.
180. Rot, A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 13: 291-294, 1992.
181. Sasu, S., D. LaVerda, N. Qureshi, D. T. Golenbock, and D. Beasley. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* 89: 244-250, 2001.
182. Schaphorst, K. L., F. M. Pavalko, C. E. Patterson, and J. G. Garcia. Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation. *Am J Respir.Cell Mol.Biol.* 17: 443-455, 1997.
183. Schenkel, A. R., Z. Mamdouh, X. Chen, R. M. Liebman, and W. A. Muller. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat.Immunol* 3: 143-150, 2002.
184. Schmiel, D. H. and V. L. Miller. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes.Infect.* 1: 1103-1112, 1999.
185. Schmitz, H. P., A. Lorberg, and J. J. Heinisch. Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol.* 44: 829-840, 2002.



186. Schnittler, H. J. and H. Feldmann. Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Curr.Top.Microbiol.Immunol* 235: 175-204, 1999.
187. Schnittler, H. J., A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, and D. Drenckhahn. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J.Physiol* 431:379-401.: 379-401, 1990.
188. Schütte, H., S. Rosseau, R. Czymek, L. Ermert, D. Walmrath, H. J. Krämer, W. Seeger, and F. Grimminger. Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am J Respir.Crit Care Med.* 156: 819-824, 1997.
189. Seeger, W., R. G. Birkemeyer, L. Ermert, N. Suttorp, S. Bhakdi, and H. R. Duncker. Staphylococcal alpha-toxin-induced vascular leakage in isolated perfused rabbit lungs. *Lab Invest* 63: 341-349, 1990.
190. Seeger, W., T. Hansen, R. Rossig, T. Schmehl, H. Schütte, H. J. Krämer, D. Walmrath, N. Weissmann, F. Grimminger, and N. Suttorp. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability--effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc.Res.* 50: 1-17, 1995.
191. Seeger, W., H. Walter, H. Neuhof, N. Suttorp, and S. Bhakdi. *Escherichia coli* hemolysin causes thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage in rabbit lungs. *Prog.Clin.Biol.Res.* 308: 67-72, 1989.
192. Senftleben, U. and M. Karin. The IKK/NF-kappa B pathway. *Crit Care Med.* 30: S18-S26, 2002.
193. Shibuya, M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct.Funct.* 26: 25-35, 2001.
194. Shindo, T., H. Kurihara, K. Maemura, Y. Kurihara, T. Kuwaki, T. Izumida, N. Minamino, K. H. Ju, H. Morita, Y. Oh-hashii, M. Kumada, K. Kangawa, R. Nagai, and Y. Yazaki. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 101: 2309-2316, 2000.
195. Singh, R., B. Wang, A. Shirvaikar, S. Khan, S. Kamat, J. R. Schelling, M. Konieczkowski, and J. R. Sedor. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J.Clin.Invest* 103: 1561-1570, 1999.

196. Sinha, B., P. Francois, Y. A. Que, M. Hussain, C. Heilmann, P. Moreillon, D. Lew, K. H. Krause, G. Peters, and M. Herrmann. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect.Immun.* 68: 6871-6878, 2000.
197. Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha_5\beta_1$ . *Cell Microbiol.* 1: 101-117, 1999.
198. Slater, S. J., J. L. Seiz, B. A. Stagliano, and C. D. Stubbs. Interaction of protein kinase C isozymes with Rho GTPases. *Biochemistry* 40: 4437-4445, 2001.
199. Soderling, S. H. and J. A. Beavo. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12: 174-179, 2000.
200. Steele-Mortimer, O., L. A. Knodler, and B. B. Finlay. Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic.* 1: 107-118, 2000.
201. Stenner-Liewen, F., H. Liewen, J. M. Zapata, K. Pawlowski, A. Godzik, and J. C. Reed. CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J Biol.Chem.* 277: 9633-9636, 2002.
202. Stevens, T., J. G. Garcia, D. M. Shasby, J. Bhattacharya, and A. B. Malik. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 279: L419-L422, 2000.
203. Sukumaran, S. K. and N. V. Prasadaraao. Regulation of protein kinase C in *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Biol.Chem.* 277: 12253-12262, 2002.
204. Summersgill, J. T., R. E. Molestina, R. D. Miller, and J. A. Ramirez. Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. *J Infect.Dis.* 181: S479-82, 2000.
205. Suttorp, N., B. Floer, H. Schnittler, W. Seeger, and S. Bhakdi. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect.Immun.* 58: 3796-3801, 1990.

206. Suttorp, N., M. Fuhrmann, S. Tannert-Otto, F. Grimminger, and S. Bhadki. Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J.Exp.Med.* 178: 337-341, 1993.
207. Suttorp, N., S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, and T. Podzuweit. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am.J.Physiol* 270: C778-C785, 1996.
208. Suttorp, N., A. Nolte, A. Wilke, and D. Drenckhahn. Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 13: 187-203, 1993.
209. Suttorp, N., M. Polley, J. Seybold, H. Schnittler, W. Seeger, F. Grimminger, and K. Aktories. Adenosine diphosphate-ribosylation of G-actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability in vitro. *J.Clin.Invest* 87: 1575-1584, 1991.
210. Suttorp, N., W. Seeger, and H. Neuhof. Effects of bacterial exo- and endotoxins on endothelial arachidonate metabolism. *Prog.Clin.Biol.Res.* 308: 119-25, 1989.
211. Suttorp, N., W. Seeger, J. Zucker-Reimann, L. Roka, and S. Bhakdi. Mechanism of leukotriene generation in polymorphonuclear leukocytes by staphylococcal alpha-toxin. *Infect.Immun.* 55: 104-110, 1987.
212. Suttorp, N., U. Weber, T. Welsch, and C. Schudt. Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J.Clin.Invest* 91: 1421-1428, 1993.
213. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81: 153-208, 2001.
214. Tanaka, K., T. Kawakami, K. Tateishi, H. Yashiroda, and T. Chiba. Control of IkappaBalpha proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie* 83: 351-356, 2001.
215. Tato, C. M. and C. A. Hunter. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect.Immun.* 70: 3311-3317, 2002.
216. Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen, and P. Engel. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9: 866-873, 1995.

217. Tiran, A., H. J. Gruber, W. F. Graier, A. H. Wagner, E. B. Van Leeuwen, and B. Tiran. Aspirin inhibits *Chlamydia pneumoniae*-induced nuclear factor-kappa B activation, cytokine expression, and bacterial development in human endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 22: 1075-1080, 2002.
218. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol* 14: 103-110, 2002.
219. Valbuena, G., H. M. Feng, and D. H. Walker. Mechanisms of immunity against *Rickettsiae*. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes.Infect.* 4: 625-633, 2002.
220. van Hinsbergh, V. W. and G. P. van Amerongen. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat.* 200: 549-560, 2002.
221. van Hinsbergh, W. M. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17: 1018-1023, 1997.
222. van Ooij, C., L. Kalman, I. van, M. Nishijima, K. Hanada, K. Mostov, and J. N. Engel. Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol.* 2: 627-637, 2000.
223. Vandahl, B. B., S. Birkelund, H. Demol, B. Hoorelbeke, G. Christiansen, J. Vandekerckhove, and K. Gevaert. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis* 22: 1204-1223, 2001.
224. Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin.Microbiol.Rev.* 14: 584-640, 2001.
225. Verin, A. D., A. Birukova, P. Wang, F. Liu, P. Becker, K. Birukov, and J. G. Garcia. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 281: L565-L574, 2001.
226. Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9: 2723-2735, 1995.
227. Vestweber, D. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14: 587, 2002.

228. Volk, T. and W. J. Kox. Endothelium function in sepsis. *Inflamm.Res.* 49: 185-198, 2000.
229. Wagner, H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14: 499-502, 2001.
230. Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683, 1998.
231. Wang, P. Adrenomedullin in sepsis and septic shock. *Shock* 10: 383-384, 1998.
232. Wang, P., M. Zhou, Z. F. Ba, W. G. Cioffi, and I. H. Chaudry. Up-regulation of a novel potent vasodilatory peptide adrenomedullin during polymicrobial sepsis. *Shock* 10: 118-122, 1998.
233. Wang, T., X. Zhang, and J. J. Li. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int.Immunopharmacol.* 2: 1509-1520, 2002.
234. Wang, Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 292: 396-401, 2002.
235. Weber, C. and W. Erl. Modulation of vascular cell activation, function, and apoptosis: role of antioxidants and nuclear factor-kappa B. *Curr.Top.Cell Regul.* 36: 217-235, 2000.
236. Willuweit, A., G. Sass, A. Schoneberg, U. Eisel, G. Tiegs, and M. Clauss. Chronic inflammation and protection from acute hepatitis in transgenic mice expressing TNF in endothelial cells. *J Immunol* 167: 3944-3952, 2001.
237. Wojciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, and A. J. Ridley. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* 114: 1343-1355, 2001.
238. Wolf, K. and T. Hackstadt. Sphingomyelin trafficking in *Chlamydia pneumoniae*-infected cells. *Cell Microbiol.* 3: 145-152, 2001.
239. Wooten, R. M., V. R. Modur, T. M. McIntyre, and J. J. Weis. *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation in human endothelial cells. *J Immunol* 157: 4584-4590, 1996.

240. Worthylake, R. A. and K. Burridge. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 569-577, 2001.
241. Yang, Y. L. and X. M. Li. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10: 169-177, 2000.
242. Yashima, R., M. Abe, K. Tanaka, H. Ueno, K. Shitara, S. Takenoshita, and Y. Sato. Heterogeneity of the signal transduction pathways for VEGF-induced MAPKs activation in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 188: 201-210, 2001.
243. Zhang, G. and S. Ghosh. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J.Clin.Invest* 107: 13-19, 2001.
244. Zhou, M., Z. F. Ba, I. H. Chaudry, and P. Wang. Adrenomedullin binding protein-1 modulates vascular responsiveness to adrenomedullin in late sepsis. *Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 283: R553-R560, 2002.
245. Zimmerman, G. A., M. R. Elstad, D. E. Lorant, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, M. K. Topham, A. S. Weyrich, and R. E. Whatley. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv.Exp.Med.Biol.* 416: 297-304, 1996.
246. Zimmerman, G. A., T. M. McIntyre, and S. M. Prescott. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin.Invest* 100: S3-S5, 1997.
247. Zuany-Amorim, C., J. Hastewell, and C. Walker. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 1: 797-807, 2002.
248. Zysk, G., B. K. Schneider-Wald, J. H. Hwang, L. Bejo, K. S. Kim, T. J. Mitchell, R. Hakenbeck, and H. P. Heinz. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect.Immun.* 69: 845-852, 2001.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer **Prof. Dr. Norbert Suttorp**, Direktor der Med. Klinik m.S. Infektiologie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin. Prof. Suttorp hat meine Bemühungen nicht nur stets praktisch unterstützt, sondern weit darüber hinaus in vielen Diskussionen wesentliche Gedanken in die Projekte eingebracht. Es macht mir bis heute großen Spass, Wissenschaft in Zusammenarbeit mit Prof. Suttorp zu betreiben.

Ohne gemeinsames Ringen um Hypothesen und Experimente wären diese Arbeiten nicht möglich gewesen. Im Verlauf trugen insbesondere **Dr. Matthias Krüll**, **Dr. Joachim Seybold**, **Dr. Martin T. U. Klockmann** und **Dr. Bernd T. Schmeck** Ideen und Taten (sowie eine gehörige und wichtige Portion Humor) bei.

Diese Habilitationsarbeit konnte nur mit Hilfe der **Koautoren** der genannten Publikationen entstehen. Ihnen allen sei für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Den technischen Angestellten (alphabetisch) in Gießen **Petra Becker**, **Heike Geisel** und **Dipl.-Ing. Susanne Tannert-Otto** sowie in Berlin **Valerie Johnston**, **Kerstin Möhr** und **Doris Stoll** danke ich herzlich für Ihre Hilfe.

Bei der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** und dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung** bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt meiner **Familie**. Meine **Eltern** unterstützten mich in all den Jahren vorbehaltlos und nachhaltig mit Rat und Tat. Ohne die praktische Hilfe, große Geduld und den enormen Zuspruch meiner Frau **Konstanze Scheurer** hätte ich nicht die Kraft besessen, diese Untersuchungen zu unternehmen. Ihre Bereitschaft zu persönlichem Verzicht ermöglichte auch das Schreiben dieser Arbeit.

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift